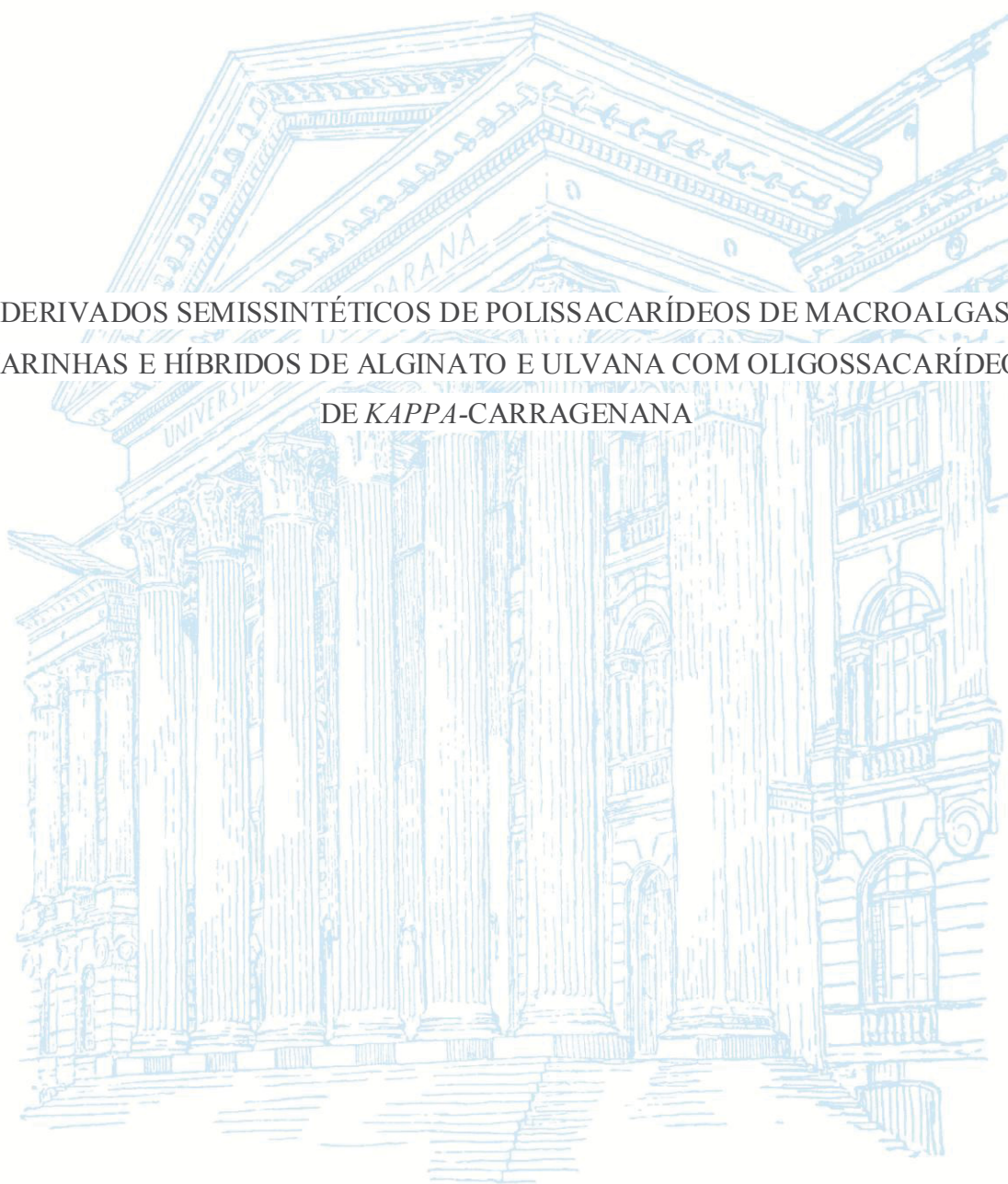


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ESTELA MUCHIUTI ARANHA

DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE POLISSACARÍDEOS DE MACROALGAS
MARINHAS E HÍBRIDOS DE ALGINATO E ULVANA COM OLIGOSSACARÍDEOS
DE *KAPPA*-CARRAGENANA



CURITIBA

2018

ESTELA MUCHIUTI ARANHA

DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE POLISSACARÍDEOS DE MACROALGAS
MARINHAS E HÍBRIDOS DE ALGINATO E ULVANA COM OLIGOSSACARÍDEOS
DE *KAPPA*-CARRAGENANA

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Eugênia Duarte Nosedá
Coorientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá
Prof. Dr. Diogo R. Bazan Ducatti

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE
BIBLIOTECAS/UFPR BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

AR662d Aranha, Estela Muchiuti
Derivados semissintéticos de polissacarídeos de macroalgas marinhas e híbridos de alginato e
ulvana com oligossacarídeos de kappa-carragenana / Estela Muchiuti Aranha. – Curitiba, 2018.
343 p. : il. color.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018.

Orientadora: Maria Eugênia Duarte Nosedá.
Coorientadores: Miguel Daniel Nosedá, Diogo R. Bazan Ducatti.

1. Polissacarídeos. 2. Modificações químicas. 3. Biotecnológicos. I. Universidade Federal do
Paraná. II. Nosedá, Maria Eugênia Duarte. III. Nosedá, Miguel Daniel. IV. Ducatti, Diogo R. Bazan.
V. Título.

CDD: 660.6


Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ESTELA MUCHIUTI ARANHA** intitulada: **DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE POLISSACARÍDEOS DE MACROALGAS MARINHAS E HÍBRIDOS DE ALGINATO E ULVANA SULFATADA COM OLIGOSSACARÍDEOS DE KAPPA-CARRAGENANA.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 25 de Maio de 2018.



MARIA EUGÊNIA RABELLO DUARTE NOSEDA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



CARMEN LUCIA DE OLIVEIRA PETKOWICZ

Avaliador Externo (UFPR)



ALAN GUILHERME GONÇALVES

Avaliador Externo (UFPR)



ADRIANO GONÇALVES VIANA

Avaliador Externo (UEPG)

Agradecimentos

Primeiramente e acima de tudo agradeço a Deus por me iluminar, trazendo paz, tranquilidade e me dando a força necessária para seguir em frente com os meus objetivos, não desanimando apesar de todas as dificuldades.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e incentivaram nesta jornada acadêmica. Obrigada por todas as oportunidades e paciência, em especial a minha mãe Aurora.

Aos meus orientadores. Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Nosedá pela excelente orientação, por toda a ajuda, paciência, conselhos, dedicação e confiança. Ao Prof. Dr. Miguel Nosedá, por toda ajuda, sugestões e contribuições, principalmente por ter aberto as portas do GLICAM. Ao Prof. Dr. Diogo Ducatti, por toda paciência, orientações, sugestões e contribuições.

Ao meu irmão Renato, que de alguma forma me proporcionou a oportunidade de voltar a vida acadêmica, realizando o doutorado.

A (Tia) Cleomara, que sempre torceu e compartilhou momentos de alegria comigo. Ao Miguel, que me proporcionou muitos momentos de descontração, felicidade, risadas e “terapia”, mesmo não tendo noção do quão bem me fazia.

As colegas e amigos do departamento de bioquímica, por toda ajuda, troca de conhecimentos e empréstimos. Em especial as meninas do E2 (Sarah, Shayla e Nicole) pela amizade construída no decorrer destes 4 anos.

As técnicas do departamento de bioquímica (Ana e Elis) por todas as análises, conversas, ajuda e conselhos, muito obrigada.

Ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e aos órgãos financiadores das pesquisas na UFPR, PRONEX-Carboidratos, Fundação Araucária, CNPq e CAPES - bolsa de Doutorado.

La vraie valeur des choses vous-même lorsque vous luttez, car elle est mesurée par l'effort que vous faites pour les atteindre. (Carlos Alexandre Cardoso)

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo promover derivatização de diferentes tipos estruturais de polissacarídeos, obtidos de macroalgas marinhas, bem como a produção de polissacarídeos híbridos através de semissíntese. *Kappa*-carragenana (K) obtida de *Kappaphycus alvarezii*, (DS 1,01) foi caracterizada através de métodos químicos e espectroscópicos e submetida a hidrólise ácida parcial (TFA 1 mol.L⁻¹, 80 °C, por 3h) originando carrabiose 4²-sulfato (KD). A fração K foi submetida a reações de sulfatação química com SO₃-Py, na presença ou ausência de 2M-2B, em diferentes temperaturas (30 e 60 °C). A reação preparativa de sulfatação química foi realizada na ausência de 2M-2B, a 60 °C, originando a fração KS-O (DS 3,66), persulfatada em C6/C4 e parcialmente sulfatada nos carbonos C2. KS-O foi submetida a hidrólise ácida parcial (TFA 1 mol.L⁻¹, 80 °C, por 45 min) originando a mistura oligossacarídica KD-OS, sulfatada parcialmente em C6 e C2, das unidades de β-D-Galp e 3,6-anidro-α-D-Galp, respectivamente. Alginato de sódio comercial (Alg-Na) foi hidrolisado parcialmente para obtenção dos blocos homopoliméricos BM e BG com 81,0 e 95,7% de pureza, respectivamente. A otimização da reação de amidação de Alg-Na, foi realizada em presença da DAP, EDC/CMC e NHS, em diferentes valores de pH (4,27; 6,0; 6,5 e 9,5). Tanto Alg-Na como os blocos BM e BG foram amidados (MES 0,2 mol.L⁻¹, 20 mols DAP, 2 mols EDC, 1mol NHS em pH 6,5, por 24 h), produzindo os derivados Alg-Dap, BM-Dap e BG-Dap com 17,8, 14,4 e 21,3% de modificação, respectivamente. A caracterização destes produtos foi realizada pela formação do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida (C1'-37,3/3,24; C2'-27,8/1,82 e C3'-38,5/2,93 ppm). As frações amidadas Alg-Dap, BM-Dap e BG-Dap foram submetidas a reações de aminação redutiva em presença de KD produzindo os polissacarídeos híbridos Alg-KD, BM-KD1, BM-KD2, BG-KD1 e BG-KD2. Estes foram caracterizados por RMN através dos deslocamentos químicos do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida (C2'' 26,4/1,86 e C3'' 46,8/3,03 ppm) e do terminal redutor das unidades de 3,6-anidro-D-Gal (51,1/3,15 ppm). A ulvana (F) (24,0% de sulfato) obtida da *Ulva fasciata*, foi submetida a reações de amidação com a DAP em presença de EDC, NHS, em diferentes valores de pHs (4,27; 6,5) e temperatura (30 e 50 °C), para otimizar as condições reacionais de amidação. A reação preparativa de amidação de F, produziu a ulvana amidada F1D onde 28,0% dos grupos carboxílicos das unidades de β-D-GlcAp foram modificados. Através da formação do grupo *N*-(3-aminopropil)amida C1'-37,5/3,05; C2'-27,7/1,94 e C3'-38,5/3,05 ppm), foi confirmando a amidação. F1D foi submetida a aminação redutiva em presença da mistura oligossacarídica KDOS, originando o polissacarídeo híbrido F1KDOS (46,1% de sulfato), caracterizada pelo deslocamento químico do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida (C2''-27,5/1,96 e C3''-46,7/3,14 ppm). A agarose comercial (Aga) foi tosilada em meio aquoso básico, originando a Aga-Tos (DS_{Tos} 1,13), a qual apresentou tosilação em C6 e C2 das unidades de β-D-Galp (70,7/4,36 e 4,22 ppm) e 3,6-anidro-α-L-Galp (78,0/4,85 ppm). Aga-Tos foi aminada utilizando meio aprótico em presença da DAP, através de uma SN₂, originando a fração Aga-Dap (DA 0,16), apresentando substituição pela DAP exclusivamente em C6 das unidades de β-D-Galp (49,3/3,06 ppm). Deste modo no presente trabalho polissacarídeos de macroalgas marinhas com diferentes motivos estruturais como o poliuronídeo alginato, seus blocos homopoliméricos, o polissacarídeo sulfatado e carboxilado denominado de ulvana e o ficocolóide neutro agarose, foram modificados via semissíntese originando produtos inéditos com potencial aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: Polissacarídeos. Modificações químicas. Biotecnológicos.

ABSTRACT

This work aimed to promote derivatization of different structural types of polysaccharides obtained from marine macroalgae, in addition to the production of hybrid polysaccharides through semisynthesis. *Kappa*-carrageenan (K) obtained from *Kappaphycus alvarezii*, (DS 1.01) was characterized by chemical and spectroscopic methods and it was submitted to partial acid hydrolysis (TFA 1 mol.L⁻¹, 80 °C, for 3h) originating carrabiose 4²-sulfato (KD). Fraction K was submitted to chemical sulfation reactions with SO₃-Py, in the presence or absence of 2M-2B, at different temperatures (30 and 60 °C). Preparative reaction of chemical sulfation was carried out in the absence of 2M-2B, at 60°C, giving the fraction KS-O (DS 3.66), persulfated in C6/C4 and partially sulfated in C2. KS-O was submitted to partial acid hydrolysis (TFA 1 mol.L⁻¹, 80 °C for 45 min) giving the KD-OS oligosaccharide mixture, partially sulfated at C6 and C2, from the β-D-Galp and 3,6-anhydro-α-D-Galp units, respectively. Commercial sodium alginate (Alg-Na) was partially hydrolyzed to obtain homopolymer blocks BM and BG with 81.0 and 95.7% purity, respectively. The optimization of the Alg-Na amidation reaction was performed in the presence of DAP, EDC/CMC and NHS at different pH values (4.27, 6.0, 6.5 and 9.5). Both Alg-Na and BM and BG blocks were amidated (MES 0.2 mol.L⁻¹, 20 mols DAP, 2 mols EDC, 1 mol NHS at pH 6.5, for 24 h), yielding Alg-Dap, BM-Dap and BG-Dap derivatives, modified with 17.8, 14.4 and 21.3% yield, respectively. Characterization of these products was accomplished by the formation of the *N*-(3-aminopropyl) -amide group (C1'-37.3/3.24, C2 '-27.8/1.82 and C3'-38.5/2.93 ppm). Alg-Dap, BM-Dap and BG-Dap were submitted to reductive amination reactions in the presence of KD, producing the hybrid polysaccharides Alg-KD, BM-KD1, BM-KD2, BG-KD1 and BG-KD2. These were characterized by NMR through the chemical shifts of the *N*-(3-aminopropyl) -amide group (C2 "26.4/1.86 and C3" 46.8/3.03 ppm) and the reducing of 3,6-anhydro-D-Gal (51.1/3.15 ppm). Ulvan (F) (24.0% sulphate) obtained from *Ulva fasciata*, was submitted to amidation reactions with DAP in the presence of EDC, NHS, at different pHs (4.27, 6.5) and temperature (30 and 50 °C), to optimize amidation reactions. The preparative amidation reaction of F produced the F1D amidated ulvana, where 28,0% of the carboxyl groups of the β-D-GlcAp units were modified. Through the formation of the *N*-(3-aminopropyl) amide C1'-37.5/3.05; C2'-27.2/1.94 and C3'-38.5/3.05 ppm), the amidation was confirmed. F1D was submitted to reductive amination in the presence of the oligosaccharide mixture KD-OS, originating the F1KDOS hybrid polysaccharide (46.1% sulfate), characterized by the chemical displacement of the *N*-(3-aminopropyl) -amide group (C2"-27.5/1.96 and C3''-46.7/3.14 ppm). Commercial agarose (Aga) was tosylated in basic aqueous medium, yielding Aga-Tos (DS_{Tos} 1.13), which exhibited C6 and C2 tosylation of β-D-Galp units (70.7/4.36 and 4.22 ppm) and 3,6-anhydro-α-L-Galp (78.0/4.85 ppm). Aga-Tos was aminated using an aprotic medium in the presence of DAP, through an SN₂, giving rise to the Aga-Dap fraction (DA 0.16), presenting substitution for DAP exclusively in C6 of β-D-Galp units (49/3.07 ppm). Thus, in the present work, polysaccharides from marine macroalgae with different structural variations such as polyuronide alginate, their homopolymeric blocks, the sulfated and carboxylated polysaccharide known as ulvana and the neutrophil agarose, were modified via semisynthesis, resulting in new products with potential biotechnological application.

Key-words: . Polysaccharides. Chemical modifications. Biotechnological.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DE CARRAGENANAS E AGARANA.	30
FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS CARRAGENANAS CONSTITUINTES DA FAMILIA <i>KAPPA</i>	33
FIGURA 3 – PRODUTOS DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DE <i>KAPPA</i> - E <i>THETA</i> -CARRAGENANA (GONÇALVES, 2005).....	38
FIGURA 4 – PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA (DUCATTI ET AL, 2011)	39
FIGURA 5 – PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA (FIGUEIREDO, 2013).....	40
FIGURA 6 – PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA (YU ET AL., 2002)	41
FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ALGÍNICO.....	47
FIGURA 8 – MODELO DA “CAIXA DE OVOS” NOS BLOCOS BG.....	48
FIGURA 9 – MODELO DO ÁCIDO ALGÍNICO PROPOSTO POR HAUG E COLABORADORES (1966).....	49
FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DA HIDROLÍSE ÁCIDA PARCIAL DO ÁCIDO ALGÍNICO	50
FIGURA 11 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO BLOCO BM E BLOCO BG.....	50
FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS DÍADES DE ULVANA PROPOSTAS POR LAHAYE (1998)	58
FIGURA 13 – FORMAÇÃO DOS GRUPOS ESTERES DE SULFATO EM REAÇÕES DE SULFATAÇÃO QUÍMICA ENVOLVENDO TRIÓXIDO DE ENXOFRE COMO AGENTE SULFATANTE.....	62
FIGURA 14 – REAÇÃO GERAL DE CONVERSÃO DE CARBOXILAS EM AMIDA EMPREGANDO CARBODIIMIDA.....	67
FIGURA 15 – ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DE CARBODIIMIDAS	67
FIGURA 16 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DAS CARBODIIMIDAS EDC E CMC	68
FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA CARBODIIMIDAS DCC	68
FIGURA 18 – ATIVAÇÃO DA CARBODIIMIDA.....	69
FIGURA 19 – MECANISMO DE FORMAÇÃO DA AMIDA A PARTIR DE CARBOXILATO EM PRESENÇA DE CARBODIIMIDA.....	70

FIGURA 20 – FORMAÇÃO DA <i>N</i> -ACILURÉIA	71
FIGURA 21 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE NHS E HOBt	72
FIGURA 22 – MECANISMO DE FORMAÇÃO DA AMIDA EM PRESENÇA DA NHS E CARBODIIMIDA.	72
FIGURA 23 – REAÇÃO GERAL DE AMINAÇÃO REDUTIVA.....	75
FIGURA 24 – MECANISMO DO ATAQUE NUCLEOFÍLICO A CARBONILA DE ALDEÍDO FORMANDO A BASE DE SCHIFF	77
FIGURA 25 – MECANISMO DE REDUÇÃO DO ÍON ÍMINIO PELO AGENTE REDUTOR CIANOBOROHIDRETO DE SÓDIO.....	77
FIGURA 26 – MECANISMO PROPOSTO DE TOSILAÇÃO.....	79
FIGURA 27 – MECANISMO PROPOSTO PARA REAÇÃO DE SN2 DO GRUPO TOSIL POR UMA AMINA.....	81
FIGURA 28 – REAÇÃO DE SEMISSÍNTESE DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALGINATO-HIALURONATO	84
FIGURA 29 – REAÇÃO DE SEMISSÍNTESE DOS POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS FD3-KB.....	86
FIGURA 30 – REAÇÃO DE SEMISSÍNTESE DOS POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS FD6-KB.....	87
FIGURA 31 – REAÇÃO DE SEMISSÍNTESE DOS POLISSACARÍDEO HÍBRIDO FN3-KB.....	89
FIGURA 32 - REAÇÃO DE SEMISSÍNTESE DOS POLISSACARÍDEO HÍBRIDO FN6-KB.....	90
FIGURA 33 – FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS BLOCOS HOMOPOLIMÉRICOS E HETEROPOLIMÉRICOS A PARTIR DO ALGINATO DE SÓDIO	95
FIGURA 34 – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA FRAÇÃO K.....	108
FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO K	109
FIGURA 36 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO K. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6).....	110
FIGURA 37 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA DÍADE [→3)-B-D-GALP 4-SULFATO-(1→4)-3,6-ANIDRO-α-D-GALP-(1→)].....	111
FIGURA 38 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO K.....	113
FIGURA 39 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO K.....	114

FIGURA 40 – ESPECTROS DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO K E DAS FRAÇÕES PERSULFATADAS KS1 – KS3.....	118
FIGURA 41 –HPSEC-MALLS-RI DAS FRAÇÕES K E KS1–KS3	120
FIGURA 42 – HPSEC DAS FRAÇÕES K E KS1–KS3	121
FIGURA 43 – MECANISMO PROPOSTO DA REAÇÃO DE SULFATAÇÃO DA <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA COM O COMPLEXO PIRIDINA-ENXOFRE	123
FIGURA 44 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS KS-O E K	127
FIGURA 45 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA KS-O. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6)	128
FIGURA 46 – INTEGRAÇÕES DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA KS-O.....	130
FIGURA 47 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DAS PRINCIPAIS UNIDADES DISSACARÍDICAS E MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NA FRAÇÃO KS-O	132
FIGURA 48 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO KS-O	133
FIGURA 49 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO KS-O.....	134
FIGURA 50 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO DISSACARÍDICA KD. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6).....	136
FIGURA 51 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA CARRABIOSE 4 ² -SULFATO..	137
FIGURA 52 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO KD.....	138
FIGURA 53 – ESPECTROS DE RMN DE HSQC DAS FRAÇÕES HIDROLISADAS FR1 – FR7	140
FIGURA 54 – INTEGRAÇÕES DOS SINAIS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES FR1 – FR7	144
FIGURA 55 – ESPECTRO DE ^{13}C -DEPT E ^{13}C DA FRAÇÃO OLIGOSSACARIDICA KD-OS.....	148
FIGURA 56 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC-EDITADO DA FRAÇÃO KD-OS. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6).....	149
FIGURA 57 – INTEGRAÇÕES DE RMN DE ^1H DOS HIDROGÊNIOS ANÔMICOS DAS UNIDADES DE 3,6-ANIDRO-D-GALACTOSE DA FRAÇÃO KD-OS.....	151
FIGURA 58 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO KD-OS.....	152
FIGURA 59 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DO ALGINATO DE SÓDIO. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5).....	154
FIGURA 60 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO ALGINATO DE SÓDIO	155

FIGURA 61 – EFEITO DA BLINDAGEM NUCLEAR CAUSADA PELA PROXIMIDADE DOS HIDROGÊNIOS AOS GRUPOS ELETRONEGATIVOS NOS BLOCOS HETEROPOLIMÉRICOS (GM) E HOMOPOLIMÉRICOS (GG).....	156
FIGURA 62 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DO ALGINATO DE SÓDIO	157
FIGURA 63 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO ALGINATO DE SÓDIO REGIÃO DO ANEL (C2-C5)	159
FIGURA 64 – HPSEC-MALLS-RI DO ALGINATO DE SÓDIO	160
FIGURA 65 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO ALGINATO DE SÓDIO	161
FIGURA 66 – INTERAÇÃO ENTRE AS UNIDADES DE ÁCIDO A-L-GULURÔNICO EM DIFERENTES PHS	163
FIGURA 67 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO FS (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5).....	164
FIGURA 68 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO FS.....	165
FIGURA 69 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO FS	167
FIGURA 70 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO BLOCO BM.....	168
FIGURA 71 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO FI. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5).....	169
FIGURA 72 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO FI.....	170
FIGURA 73 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO FI.....	171
FIGURA 74 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO BLOCO BG	172
FIGURA 75 – HPSEC-MALLS-RI DO BLOCO BM	173
FIGURA 76 – HPSEC-MALLS-RI DO BLOCO BG	174
FIGURA 77 – HPSEC DO ALGINATO DE SÓDIO E DOS BLOCOS BM E BG.....	174
FIGURA 78 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO BLOCO BM (A) BLOCO BG (B)	175
FIGURA 79 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H INTEGRADO DOS PRODUTOS DE AMIDAÇÃO DO ALGINATO (ENTRADA A07)	178
FIGURA 80 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO ALG-DAP. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO I-(3-AMINOPROPIL)-AMIDA.....	186
FIGURA 81 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO ALG-DAP.....	188
FIGURA 82 – INTEGRAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO ALG-DAP	190

FIGURA 83 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL HIPOTÉTICA DA FRAÇÃO ALG-DAP	192
FIGURA 84 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO ALG-DAP	194
FIGURA 85 – HPSEC DAS FRAÇÕES ALG E ALG-DAP	194
FIGURA 86 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO ALG-DAP	195
FIGURA 87 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO BM-DAP (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO <i>N</i> -(3-AMINOPROPIL)-AMIDA	197
FIGURA 88 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA REGIÃO DAS CARBOXILAS DO BLOCO BM (A) E DA FRAÇÃO BM-DAP (B)	199
FIGURA 89 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO BG-DAP (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO <i>N</i> -(3-AMINOPROPIL)-AMIDA	201
FIGURA 90 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA REGIÃO DAS CARBOXILAS DO BLOCO BG (A) E DA FRAÇÃO BG-DAP (B)	203
FIGURA 91 – INTEGRAÇÃO DOS SINAIS NO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA FRAÇÃO BM-DAP	206
FIGURA 92 – INTEGRAÇÃO DOS SINAIS NO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA FRAÇÃO BG-DAP	207
FIGURA 93 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL HIPOTÉTICA DAS FRAÇÕES BM-DAP E BG-DAP	208
FIGURA 94 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO BM-DAP	209
FIGURA 95 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO BG-DAP	209
FIGURA 96 – HPSEC DO BLOCO BM E DA FRAÇÃO BM-DAP	210
FIGURA 97 – HPSEC DO BLOCO BG E DA FRAÇÃO BG-DAP	210
FIGURA 98 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES BM-DAP E BG-DAP	211
FIGURA 99 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO <i>N</i> -(3-AMINOPROPIL)	215
FIGURA 100 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL HIPOTÉTICA DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD	218
FIGURA 101 – HPSEC-MALLS-RI DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD	220

FIGURA 102 – HPSEC DAS FRAÇÕES ALG-NA, ALG-DAP E DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD	220
FIGURA 103 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD	221
FIGURA 104 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC-EDITADO DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD1 (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO <i>N</i> -(3-AMINOPROPIL).....	224
FIGURA 105 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL HIPOTÉTICA DO POLISSACARÍDIO HÍBRIDO BM-KD1	227
FIGURA 106 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD2 (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO <i>N</i> -(3-AMINOPROPIL).....	229
FIGURA 107 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL HIPOTÉTICA DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD2	232
FIGURA 108 – HPSEC-MALLS-RI DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD1	234
FIGURA 109 – HPSEC-MALLS-RI DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD2	234
FIGURA 110 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS BM-KD2 E BM-KD1	235
FIGURA 111 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC-EDITADO DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD1 (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO <i>N</i> -(3-AMINOPROPIL).....	237
FIGURA 112 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL HIPOTÉTICA DO POLISSACARÍDIO HÍBRIDO BG-KD1	241
FIGURA 113 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD2 (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO <i>N</i> -(3-AMINOPROPIL)	243
FIGURA 114 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL HIPOTÉTICA DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD2	246
FIGURA 115 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD1.....	248
FIGURA 116 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD2.....	248
FIGURA 117 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DOS OLIGOSSACARÍDEOS HÍBRIDOS BG-KD1 E BG-KD2.....	249

FIGURA 118 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO F. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6).....	252
FIGURA 119 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO F	254
FIGURA 120 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO F	257
FIGURA 121 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS DÍADES $\text{A}_{3\text{S}}$ E $\text{B}_{3\text{S}}$	258
FIGURA 122 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H INTEGRADO DOS PRODUTOS DE AMIDAÇÃO DA ULVANA (ENTRADA F01).....	260
FIGURA 123 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO F1D. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6) (C) REGIÃO DO GRUPO N-(3-AMINOPROPIL).....	267
FIGURA 124 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO F1D	269
FIGURA 125 – INTEGRAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO F1D....	271
FIGURA 126 – ESTRUTURA HIPOTÉTICA DA DÍADE ULVANOBIURÔNICO 3-SULFATO TIPO A AMIDADA COM A DAP	272
FIGURA 127 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO F1D.....	273
FIGURA 128 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO F1KD-OS. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6) (C) REGIÃO DO GRUPO N-(3-AMINOPROPIL).....	276
FIGURA 129 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO ANOMÉRICA DA FRAÇÃO F1D(A) E DA FRAÇÃO F1KD-OS(B)	278
FIGURA 130 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO DO ANEL (C2 – C6) DA FRAÇÃO F1D(A) E DA FRAÇÃO F1KD-OS (B).....	279
FIGURA 131 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO F1KDOS.....	280
FIGURA 132 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO AGAROSE REDUZIDA...	282
FIGURA 133 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AGAROSE REDUZIDA. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6).....	283
FIGURA 134 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA DÍADE $[\rightarrow 3)\text{-B-D-GALP-(1}\rightarrow 4)\text{-3,6-ANIDRO-}\alpha\text{-L-GALP-(1}\rightarrow]$	284
FIGURA 135 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AGAROSE REDUZIDA	285
FIGURA 136 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA AGA-TOS	288
FIGURA 137 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AGA-TOS.....	289
FIGURA 138 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AGA-TOS (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6).....	290

FIGURA 139 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H INTEGRADO DA AGA-TOS PARA O CÁLCULO DE DS_{TOS}	293
FIGURA 140 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA HIPOTÉTICA DA AGA-TOS ..	294
FIGURA 141 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AGAROSE TOSILADA	295
FIGURA 142 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AGA-DAP. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6) (C) REGIÃO DO GRUPO <i>N</i> -(3-AMINOPROPIL)-AMINA.....	298
FIGURA 143 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA AGA-DAP.....	300
FIGURA 144 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AGA-DAP	301
FIGURA 145 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA HIPOTÉTICA DA AGAROSE AMINADA	304
FIGURA 146 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AGAROSE AMINADA.....	305

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS	31
TABELA 2 – RELAÇÃO M:G DE ÁCIDOS ALGÍNICOS OBTIDOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MACROALGAS PARDAS	51
TABELA 3 – DIFERENTES CONDIÇÕES REACIONAIS PARA SULFATAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS	66
TABELA 4 – MODIFICAÇÕES QUÍMICA E APLICAÇÕES DOS DERIVADOS DO ALGINATO DE SÓDIO	74
TABELA 5 – CONDIÇÕES REACIONAIS DE AMINAÇÃO REDUTIVA DA FRAÇÃO BM-DAP E KD	97
TABELA 6 – CONDIÇÕES REACIONAIS DE AMINAÇÃO REDUTIVA DA FRAÇÃO AC. GUL-DAP E KD	98
TABELA 7 – MASSAS MOLARES PONDERAIS MÉDIAS (MW), TEMPOS DE RETENÇÕES E EQUAÇÃO DE REGRESSÃO LINEAR DAS CURVAS PADRÕES	103
TABELA 8 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DA FRAÇÃO F	111
TABELA 9 – ANÁLISE DE SULFATO NA FRAÇÃO K	112
TABELA 10 – OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PERSULFATAÇÃO DA KAPPA-CARRAGENANA	116
TABELA 11 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ KAPPA-CARRAGENANA PERSULFATADA	120
TABELA 12 – TEMPOS DE RETENÇÃO E MASSAS MOLARES PONDERAIS MÉDIAS (MW) DA FRAÇÃO K E DAS FRAÇÕES QUIMICAMENTE SULFATADAS KS1 – KS3	121
TABELA 13 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS DÍADES CONSTITUINTES DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA KS-O	131
TABELA 14 – ANÁLISE DE SULFATO NA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA KS-O	132
TABELA 15 – ASSINALAMENTOS DOS $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DA CARRABIOSE 4 ² -SULFATO	137
TABELA 16 – PORCENTAGENS DE UNIDADES SULFATADAS NAS FRAÇÕES FR1 – FR7	145

TABELA 17 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS UNIDADES DE A-L-GULUPIRANOSIDURÔNICO (G) E B-D-MANUPIRANOSIDURÔNICO (M) NO ALGINATO DE SÓDIO	156
TABELA 18 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DOS BLOCOS BM E BG	172
TABELA 19 – VALORES DE MASSA MOLECULAR DOS REAGENTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE OTIMIZAÇÃO DE AMIDAÇÃO VIA CARBODIIMIDA	176
TABELA 20 – REAÇÕES DE OTIMIZAÇÃO DA AMIDAÇÃO VIA CARBODIIMIDA DO ALGINATO DE SÓDIO	180
TABELA 21 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS UNIDADES CONSTITUINTES DA FRAÇÃO ALG-DAP	189
TABELA 22 – ANÁLISE ELEMENTAR DO ALGINATO DE SÓDIO E SEU DERIVADO AMIDADO (ALG-DAP)	192
TABELA 23 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES BM-DAP E BG-DAP	204
TABELA 24 ANÁLISE ELEMENTAR DAS FRAÇÕES NATIVAS E MODIFICADAS VIA AMIDAÇÃO DOS BLOCOS BM E BG	205
TABELA 25 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD	217
TABELA 26 – DOSAGEM DE CARBONO E NITROGÊNIO NO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD E SEUS PRECURSORES	219
TABELA 27 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD1	226
TABELA 28 – ASSINALAMENTOS DOS $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD2	231
TABELA 29 – DOSAGEM DE CARBONO E NITROGÊNIO NOS POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS MB-KD1 MB-KD2 E SEUS PRECURSORES	233
TABELA 30 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD1	240
TABELA 31 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD2	245
TABELA 32 – DOSAGEM DE CARBONO E NITROGÊNIO NOS POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS BG-KD1 BG-KD2 E SEUS PRECURSORES	247

TABELA 33 – PROPORÇÕES DAS DÍADES PRESENTES NA ULVANA DE <i>U. FASCIATA</i>	250
TABELA 34 – ASSINALAMENTOS DOS $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DAS DÍADES CONSTITUINTES DA FRAÇÃO F	255
TABELA 35 – ANÁLISE DE SULFATO NA FRAÇÃO F	256
TABELA 36 – VALORES DE MASSA MOLECULAR DOS REAGENTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE OTIMIZAÇÃO DE AMIDAÇÃO VIA CARBODIIMIDA DA ULVANA	259
TABELA 37 – REAÇÕES DE OTIMIZAÇÃO DA AMIDAÇÃO VIA CARBODIIMIDA DA ULVANA.....	263
TABELA 38 – ANÁLISE ELEMENTAR DA ULVANA E SEU DERIVADO AMIDADO	270
TABELA 40 – DOSAGEM DE CARBONO, NITROGÊNIO, SULFATO E ENXOFRE NO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO F1KD-OS E SEUS PRECURSORES (F, F1D E KS-O)	275
TABELA 41 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS UNIDADES PRESENTES NA AGAROSE REDUZIDA	284
TABELA 43 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES PRESENTES EM AGA-TOS.....	291
TABELA 45 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES PRESENTES EM AGA-DAP	302
TABELA 46 – ANÁLISE ELEMENTAR DA AGAROSE AMINADA (AGA-DAP) E SEUS PRECURSORES (AGA, AGA-TOS)	303

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2M-2B	- 2-metil-2-butenio
Aga-Dap	- Agarose aminada
Aga-Tos	- Agarose tosilada
Alg-Na	- Alginato de sódio
Alg-Dap	- Fração amidada do alginato de sódio
Alg-KD	- Fração híbrida do alginato de sódio
AgNP	- Nanopartículas de prata
ATR/FTIR	- Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada
Bloco BG	- Poligulurônico obtido por hidrólise parcial ácida do alginato de sódio
Bloco BG-Dap	- Fração amidada do poligulurônico
Bloco BG-KD1	- Fração híbrida do poligulurônico
Bloco BG-KD2	- Fração híbrida do poligulurônico
Bloco BM	- Polimanurônico obtido por hidrólise parcial ácida do alginato de sódio
Bloco BM-Dap	- Fração amidada do polimanurônico
Bloco BM-KD1	- Fração híbrida do polimanurônico
Bloco BM-KD2	- Fração híbrida do polimanurônico
BMIMCl	- Cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio
DMAP	- 4-dimetilaminopiridina
COSY	- <i>Correlation spectroscopy</i>
CMC	- <i>N</i> -ciclohexil- <i>N'</i> -(2-morfolinoetil) carbodiimida
Da	- Dalton
DAP	- 1,3-propanodiamina
DCC	- <i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DMAc	- <i>N,N</i> -dimetilacetamida
DMFa	- Dimetil formamida anidra
DMSO	- Dimetil sulfóxido
DMSO- <i>d</i> 6	- Dimetil sulfóxido deuterado
DS	- Grau de substituição
DA	- Grau de substituição do grupo amino (DAP)
DS _{Tos}	- Grau de substituição do grupo tosil
EDC	- Hidroclorato de <i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida

EDA	- 1,2-etilenodiamina
F	- Fração bruta obtida por extração aquosa a 80 °C da <i>Ulva fasciata</i>
F1D	- Fração amidada da ulvana
F1-KDOS	- Fração híbrida da ulvana
HMBC	- Heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy
HSQC	- Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy
HPSEC-IR-MALLS	- Cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detectores de índice de refração e espalhamento de luz em multiângulos
IL	- Líquidos iônicos
K	- Fração bruta obtida por extração aquosa a 65 °C da <i>Kappaphycus alvarezii</i>
KD	- Produto de hidrólise ácida parcial da fração K
KD-OS	- Produto de hidrólise ácida parcial da fração KS-O
KS-O	- Fração sulfatada quimicamente com complexo trióxido de enxofre piridina a 60 °C
MES	- Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino)-etanossulfônico
MWCO	- <i>Molecular weight cut-off</i>
P4S	- Ácido piperidino- <i>N</i> -sulfônico
RI	- Índice de refração
RMN	- Ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio um
RMN ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN 1D	- Ressonância magnética nuclear unidimensional
RMN 2D	- Ressonância magnética nuclear bidimensional
ppm	- Partes por milhão
m/v	- Relação entre massa e volume
nd	- Não detectado
NHS	- <i>N</i> -hidroxisuccinamida
RPM	- Rotações por minuto
SO3-Py	- Complexo trióxido de enxofre piridina
Tos	- Grupo toсила
TsCl	- Cloreto de <i>p</i> -toluenossulfonila
TFA	- Ácido trifluoracético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	OBJETIVOS	27
1.1.	Objetivo Geral	27
1.1.1	Objetivos Específicos	27
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	28
2.1	ALGAS	28
2.2	GALACTANAS SINTETIZADAS POR ALGAS VERMELHAS	29
2.2.1	Estabilidade dos grupos éster de sulfato nas galactanas.....	34
2.2.2	Estabilidade das ligações glicosídicas nas galactanas obtidas das algas vermelhas .	35
2.2.3	Produção de oligossacarídeos a partir de hidrólise ácida parcial de galactanas	36
2.2.4	Aplicação e produção das carragenanas	42
2.2.5	Propriedades biológicas das galactanas e seus produtos de hidrólise	43
2.3	POLIURONÍDEOS SINTETIZADOS POR ALGAS PARDAS.....	44
2.3.1	Ácido algínico	45
2.3.2	Composição química de alginatos obtidos de diferentes espécies de macroalga pardas	48
2.3.3	Aplicação e produção do alginato	52
2.3.4	Propriedades biológicas do alginato e seus produtos de hidrólise	53
2.4	ULVANAS EXTRAÍDAS DE MACROALGAS VERDES	56
2.4.1	Aplicações e produção das ulvanas	58
2.4.2	Propriedades biológicas das ulvanas	59
2.5	MODIFICAÇÕES QUÍMICA EM POLISSACARÍDEOS	60
2.5.1	Sulfatação química de polissacarídeos	61
2.5.2	Amidação de polissacarídeos	67
2.5.3	Aminação reductiva.....	75
2.5.4	Tosilação.....	78
2.5.5	Aminação.....	80
2.6	COPOLIMERIZAÇÃO DE ENXERTIA.....	82
3	MATERIAIS E MÉTODOS	91
3.1	MATERIAIS	91
3.2	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA <i>K. ALVAREZII</i>	91
3.3	SULFATAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO K	91

3.3.1	Otimização da reação de sulfatação da fração K	91
3.3.2	Semissíntese de KD-O	92
3.4	HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO K	92
3.5	HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO KS-O	93
3.5.1	Curva de hidrólise ácida parcial da fração KS-O	93
3.5.2	Semissíntese da fração KD-OS	93
3.6	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO ALGINATO DE SÓDIO	93
3.6.1	Produção dos blocos BM e BG a partir do alginato de sódio	93
3.6.2	Otimização da reação de amidação dos grupos carboxilas do alginato de sódio utilizando derivados carbodiimidas	95
3.6.3	Semissíntese de Alg-Dap	96
3.6.4	Semissíntese de BM-Dap e BG-Dap	96
3.7	SEMISSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS CARBOXILADOS E SULFATADOS VIA AMINAÇÃO REDUTIVA UTILIZANDO OS DERIVADOS DO ALGINATO	97
3.7.1	Semissíntese de Alg-KD	97
3.7.2	Semissíntese de BM-KD1 e BM-KD2	97
3.7.3	Semissíntese de BG-KD1 e BG-KD2	98
3.8	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA <i>U. FASCIATA</i>	98
3.8.1	Otimização da reação de amidação dos grupos carboxila da ulvana utilizando carbodiimida	98
3.8.2	Semissíntese de F1D	99
3.8.3	Semissíntese de F1KDOS	99
3.9	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA AGAROSE	100
3.9.1	Semissíntese de Aga-Tos	100
3.9.2	Semissíntese de Aga-Dap	100
3.10	MÉTODOS ANALÍTICOS	100
3.10.1	Dosagens dos grupos O-sulfato	100
3.10.2	Determinação dos teores de nitrogênio e carbono	101
3.11	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	102
3.11.1	Cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detector de índice de refração e espalhamento de luz em multiângulos (HPSEC-IR-MALLS)	102
3.12	MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	103

3.12.1	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR/FTIR)	103
3.12.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	104
3.12.3	Análises de RMN monodimensionais	104
3.12.4	Análises de RMN bidimensionais	105
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	106
4.1	KAPPA-CARRAGENANA – EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, SULFATAÇÃO QUÍMICA E PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS.....	107
4.1.1	Caracterização química e espectroscópica da fração K	107
4.1.2	Otimização da reação de sulfatação da fração K.....	114
4.1.3	Semissíntese de KS-O	124
4.1.4	Produção de oligossacarídeos redutores a partir das frações K e KS-O.....	134
4.1.4.1	Hidrólise ácida parcial da fração K	135
4.1.4.2	Hidrólise ácida parcial da fração KS-O.....	138
4.1.4.2.1	Curva de hidrólise ácida parcial da fração KS-O	138
4.1.4.2.2	Semissíntese de KD-OS	145
4.2	ALGINATO DE SÓDIO – CARACTERIZAÇÃO, PRODUÇÃO DE BLOCOS HOMOPOLIMÉRICOS, AMIDAÇÃO E SEMISSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS	152
4.2.1	Caracterização química e espectroscópica do alginato de sódio	152
4.2.2	Produção dos blocos homopoliméricos a partir de Alg-Na.....	161
4.2.3	Conversão das carboxilas do alginato e seus derivados em amidas	175
4.2.4	Síntese de Alg-Dap	183
4.2.5	Semissíntese de BM-Dap e BG-Dap	195
4.2.6	Semissíntese de polissacarídeos híbridos carboxilados e sulfatados via aminação reductiva dos derivados do alginato	211
4.2.6.1	Semissíntese de Alg-KD.....	212
4.2.6.2	Semissíntese de BM-KD1 e BM-KD2	221
4.2.6.3	Semissíntese de BG-KD1 e BG-KD2.....	235
4.3	SEMISSÍNTESE DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO DE ULVANA-OLIGOSSACARÍDEO DERIVADO DA KAPPA-CARRAGENANA PERSULFATADA	250
4.3.1	Caracterização química e espectroscópica da Ulvana	250

4.3.2	Otimização da reação de amidação dos grupos carboxilas da ulvana utilizando carbodiimida	258
4.3.3	Semissíntese de F1D.....	265
4.3.4	Semissíntese de F1KDOS.....	273
4.4	FUNCIONALIZAÇÃO DA AGAROSE	281
4.4.1	Caracterização química e espectroscópica da agarose	281
4.4.2	Semissíntese de Aga-Tos.....	285
4.4.3	Semissíntese de Aga-Dap	295
5	CONCLUSÕES	306
	REFERÊNCIAS	309
	ANEXOS	326

1 INTRODUÇÃO

As macroalgas marinhas são fontes abundantes de diferentes tipos de polissacarídeos, dentre os quais se destacam o ácido algínico, carragenanas e ulvanas. Os polissacarídeos derivados das macroalgas apresentam aplicações diversificadas, desde setores da indústria alimentícia, até as áreas biomédicas (COOK et al., 2018; PARK et al., 2017; SUN et al., 2018)

A expansão do uso destes biopolímeros se deve principalmente por apresentarem estruturas químicas únicas, de fontes renováveis, com baixo custo, biodegradabilidade e biocompatibilidade (LAHAYE; ROBIC, 2007; TAVASSOLI-KAFRANI; SHEKARCHIZADEH; MASOUDPOUR-BEHABADI, 2016).

Os polissacarídeos provenientes de macroalgas marinhas veem sendo foco de estudos principalmente nas áreas de biotecnologia, sendo utilizados por exemplo para matrizes para engenharia de tecidos, biossensores, sistemas controlados para a entrega de compostos bioativos e como fármacos terapêuticos anti-tumorais (KIM et al., 2017; PARK et al., 2017; RAMOS et al., 2017).

Entretanto, para que estes biomateriais apresentem características e propriedades específicas para determinadas aplicações biotecnológicas, se faz necessário a realização de modificações químicas na estrutura destes polissacarídeos, visando alterar suas propriedades físico-químicas e/ou biológicas. Os polissacarídeos são moléculas estruturalmente versáteis, apresentando por exemplo grupos hidroxilas e/ou carboxilas livres, os quais são importantes grupos funcionais, tornando possível a derivatização química, resultando em derivados com propriedades diferentes dos polissacarídeos precursores (SIDDHANTA et al., 2015).

Dentre estes polissacarídeos se destacam as ulvanas, polissacarídeos extraídos de macroalgas verdes, com grande versatilidade e potencial biotecnológico, entretanto pouco explorados. As ulvanas vêm sendo recentemente modificados quimicamente por pesquisadores do grupo de pesquisa de Glicobiologia Estrutural de Algas Marinhas (GLICAM), do departamento de Bioquímica e Biologia molecular da UFPR, para produção de novos biomateriais.

O presente trabalho teve como objetivo a derivatização de diferentes tipos de polissacarídeos: alginato, *kappa*-carragenana, ulvana e agarose, através de reações de sulfatação química, tosilação, amidação, aminação e aminação redutiva. Adicionalmente, foram produzidos através de reações de semissínteses seis

polissacarídeos híbridos. Tanto os polissacarídeos híbridos como os amidados e/ou aaminados são compostos com potencial aplicação biotecnológica.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi realizar modificações químicas, em polissacarídeos de macroalgas marinhas, além de produzir polissacarídeos híbridos por semissíntese.

1.1.1.1 Objetivos Específicos

- a) Extrair e sulfatar quimicamente a *kappa*-carragenana extraída da macroalga *Kappaphycus alvarezii*;
- b) Produzir oligossacarídeos redutores a partir de hidrólise ácida parcial utilizando *kappa*-carragenana nativa e após sulfatação química;
- c) Produzir blocos homopoliméricos a partir do alginato de sódio;
- d) Otimizar a reação de amidação do alginato de sódio utilizando a 1,3-propanodiamina;
- e) Amidar o alginato de sódio e seus blocos homopoliméricos, utilizando a 1,3-propanodiamina;
- f) Através da aminação redutiva, produzir polissacarídeos híbridos entre os derivados amidados (alginato de sódio, e blocos homopoliméricos) e o produto de hidrólise ácida parcial da *kappa*-carragenana;
- g) Otimizar a reação de amidação da ulvana obtida da alga *Ulva fasciata*;
- h) Amidar a ulvana utilizando a 1,3-propanodiamina;
- i) Através da aminação redutiva, produzir o polissacarídeo híbrido entre o derivado amidado da ulvana e o produto de hidrólise ácida parcial da *kappa*-carragenana sulfatada quimicamente;
- j) Tosilar a agarose;
- k) Amidar o derivado tosilado da agarose;
- l) Caracterizar os derivados e produtos finais das modificações químicas realizadas nos polissacarídeos (*kappa*-carragenana, alginato de sódio, ulvana e agarose) através de métodos químicos e espectroscópicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ALGAS

Desde o século XVII as algas marinhas tem sido comercializadas principalmente no Japão, e somente um século depois foi iniciada sua prática na Europa (PERCIVAL; McDOWELL, 1967). Entretanto existem registros que as pessoas já coletavam e utilizavam macroalgas como alimentos, desde os anos 500 a.c. na China. (BARSANTI; GUALTIERI, 2010).

Aproximadamente 500 espécies de algas marinhas vêm sendo utilizadas há séculos para fins alimentares e medicinais, diretamente (principalmente na Ásia) ou indiretamente, principalmente pela indústria de ficocolóides (agar, carragenanas e alginatos). Estes materiais obtidos naturalmente fomentam uma indústria que movimenta bilhões de dólares, incluindo produtos alimentares, têxteis, farmacêuticos, nutracêuticos, cosméticos, botânicos, agroquímicos, alimentos para animais, compostos bioativos e antivirais além de setores biotecnológicos. Esta indústria não é muito conhecida pelos consumidores, apesar de usarem produtos de algas marinhas quase diariamente (do suco de laranja pela manhã até a pasta de dentes à noite) (CHOPIN; SAWHNEY, 2008).

As algas compreendem um grupo diversificado de organismos, que podem ou não estarem relacionados filogeneticamente. Existem estimativas que reportam a existência de aproximadamente 30.000 a mais de 1 milhão de diferentes espécies de algas (GUIRY, 2012).

O termo alga refere-se tanto as macroalgas como a um grande grupo de micro-organismos conhecidos como microalgas, os quais apresentam tamanhos e formas variadas. Exemplos da enorme diversidade estrutural destes organismos são: o picoplankton (compostos por células entre 0,2 – 2,0 μm) e as gigantes kelps (com até 100 m de comprimento). Estes organismos também se distinguem quanto ao habitat colonizado, já que as algas possuem a capacidade de ocupar todos os ambientes aos quais lhes sejam disponibilizado luz e a umidade necessária. Desta forma podem ser encontradas tanto em águas doces ou salgadas, sobre os solos úmidos ou troncos e até mesmo sobre a neve, vivendo isolados ou em associações com outros organismos, como por exemplo, o líquen: alga associada com fungo. Além disto, exibem diferentes estruturas celulares, níveis de organização, morfologia, diferentes pigmentos, os quais

são os responsáveis pela capacidade de realizarem a fotossíntese, além de uma ampla diversidade de polissacarídeos de reserva e estrutural (BARSANTI; GUALTIERI, 2010 ; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Dentre os diferentes tipos de polissacarídeos presentes nas macroalgas marinhas, estão presentes as galactanas, ulvanas e os urônídeos.

2.2 GALACTANAS SINTETIZADAS POR ALGAS VERMELHAS

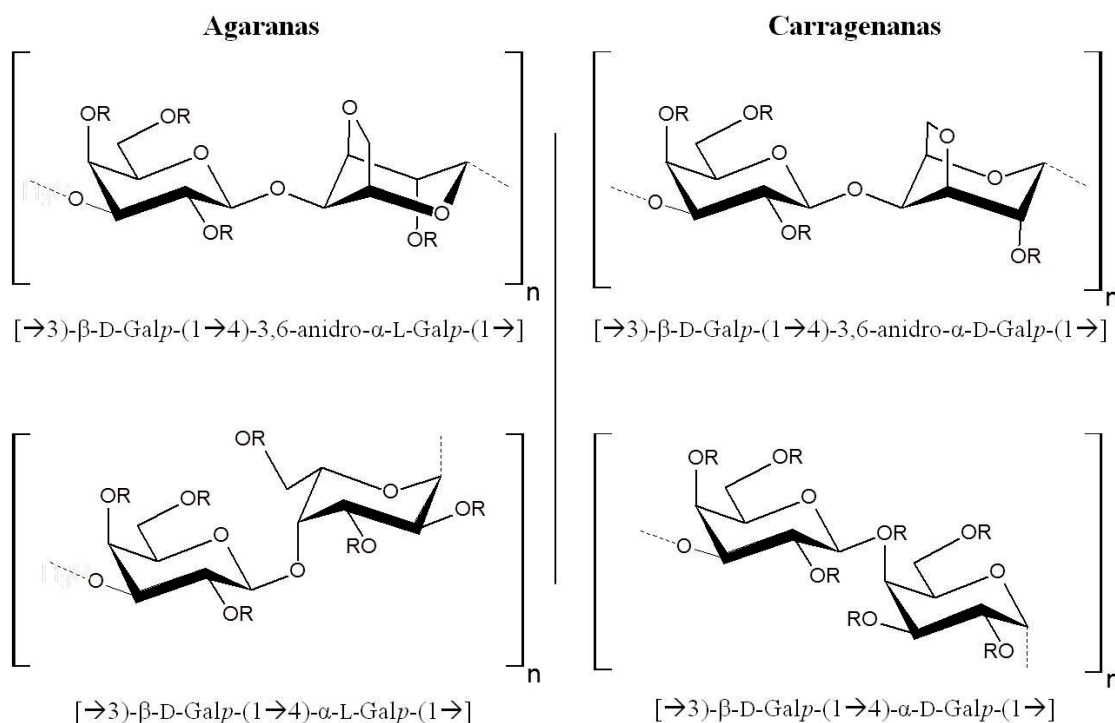
As macroalgas vermelhas pertencentes ao filo Rhodophyta, representam mais de 7000 espécies do reino Plantae, sendo habitantes comuns em águas marinhas tropicais e temperadas, onde desempenham importantes papéis na economia e ecologia (ALGAEBASE, 2017; BARSANTI; GUALTIERI, 2010).

As galactanas são os principais polissacarídeos solúveis em meio aquoso, produzidas pela maioria das espécies de algas vermelhas. São constituídas por unidades repetitivas de β -D-galactopirranose ligada (1 \rightarrow 3), e α -galactopirranose ligada (1 \rightarrow 4) (PAINTER, 1983), denominadas de unidades **A** e **B**, respectivamente.

Existem dois grandes grupos de galactanas, que se diferenciam pela estereoquímica da unidade **B** 4-*O*-ligadas: enantiômeros L-(agaranas) e enantiômeros D-(carragenanas). Além disto, tanto na unidade **A** como a **B**, podem ter os grupos hidróxilos substituídos por grupos *O*-sulfato e *O*-metil. A galactose 3-*O*-ligada pode apresentar ainda grupo acetal cíclico de ácido pirúvico nas posições 4 e 6, enquanto a galactose 4-*O*-ligada pode estar total ou parcialmente ciclizadas na forma de 3,6-anidrogallactopirranose (KNUTSEN et al., 2002; KOLENDER; MATULEWICZ, 2004; STORTZ; CASES; CEREZO, 1997; STORTZ; CEREZO, 1991; USOV, 1998; DUARTE et al., 2004) A FIGURA 1 representa a estrutura química repetitiva básica que constituem as agaranas e as carragenanas.

As agaranas apresentam grande diversidade estrutural, como a presença de grupos *O*-metil principalmente no carbono-6 das unidades **A** e no carbono-2 das unidades **B**, substituição por grupos 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno), bem como a presença de grupos *O*-sulfato em diferentes posições. Adicionalmente, alguns exemplares de algas vermelhas sintetizam principalmente a agarose, uma agarana neutra (unidade **A** sem substituição, e unidade **B** na forma de 3,6-anidro- α -L-galactose) (DUARTE et al., 2004; DUCKWORTH; YAPHE, 1971; FERREIRA et al., 2012).

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DE CARRAGENANAS E AGARANA



R: Grupos hidróxilos, sulfato, metil ou acetal de ácido pirúvico. FONTE: O autor (2018).

Já as carragenanas apresentam diferentes padrões de sulfatação, baixa ocorrência de grupos *O*-metil e acetal de ácido pirúvico. Estas moléculas podem ser classificadas de acordo com a posição dos grupos *O*-sulfato nas unidades **A** e **B**. Variando o teor e a posição dos grupos sulfatos, além da presença ou ausência da 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose, podem constituir 42 estruturas dissacarídicas teoricamente distintas (STORTZ; CEREZO, 1992) Entretanto apenas algumas já foram descritas na literatura. As carragenanas são classificadas com letras gregas conforme o teor e a posição do sulfato.

Devido à vasta diversidade estrutural das galactanas, KNUTSEN e colaboradores (1994), propuseram uma nomenclatura simbólica para as unidades repetitivas constituintes das galactanas, com o intuito de padronizar e facilitar a escrita das unidades dissacarídicas (díades). As unidades de β -D-galactopiranosose são representadas pela letra G, enquanto as unidades de α -L-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose pertencentes ao grupo das agaranas são representadas pelas letras L e LA, respectivamente, e as unidades de α -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose pertencentes ao grupo das carragenanas são representadas pelas letras D e DA, respectivamente.

Na TABELA 1 estão apresentados 15 diferentes carragenanas identificadas por letras gregas (α , β , γ , δ , θ , ι , κ , λ , μ , ν , ξ , \omicron , π , ψ e ω), classificadas com relação ao grupo sulfato, famílias e código de letras, conforme a classificação de KNUTSEN E colaboradores (1994).

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS

Nome grego	Letra grega	Família	Unidade A	Unidade B	Código de letras
<i>alpha</i>	α	<i>beta</i>	β -D-Galp	3,6-An- α -D-Galp 2-sulfato	G-DA2S
<i>beta</i>	β	<i>beta</i>	β -D-Galp	3,6-An- α -D-Galp	G-DA
<i>gamma</i>	γ	<i>beta</i>	β -D-Galp	α -D-Galp 6-sulfato	G-D6S
<i>delta</i>	δ	<i>beta</i>	β -D-Galp	α -D-Galp 2,6-disulfato	G-D2S,6S
<i>theta</i>	θ	<i>lambda</i>	β -D-Galp 2-sulfato	3,6-An- α -D-Galp 2-sulfato	G2S-DA2S
<i>iota</i>	ι	<i>kappa</i>	β -D-Galp 4-sulfato	3,6-An- α -D-Galp 2-sulfato	G4S-DA2S
<i>kappa</i>	κ	<i>kappa</i>	β -D-Galp 4-sulfato	3,6-An- α -D-Galp	G4S-DA
<i>lambda</i>	λ	<i>lambda</i>	β -D-Galp 2-sulfato	α -D-Galp 2,6-disulfato	G2S-D2S,6S
<i>mu</i>	μ	<i>kappa</i>	β -D-Galp 4-sulfato	α -D-Galp 6-sulfato	G4S-D6S
<i>nu</i>	ν	<i>kappa</i>	β -D-Galp 4-sulfato	α -D-Galp 2,6-disulfato	G4S-D2S,6S
<i>xi</i>	ξ	<i>lambda</i>	β -D-Galp 2-sulfato	α -D-Galp 2-sulfato	G2S-D2S
<i>omicron</i>	\omicron	-	β -D-Galp 4-sulfato	α -D-Galp 2-sulfato	G4S-D2S
<i>PI</i>	π	<i>lambda</i>	β -D-Galp-4,6-O-(1-carboxietilideno)-2-sulfato	α -D-Galp 2-sulfato	GP,2S-D2S
<i>Psi</i>	ψ	<i>omega</i>	β -D-Galp 6-sulfato	α -D-Galp 6-sulfato	G6S-D6S
<i>omega</i>	ω	<i>Omega</i>	β -D-Galp 6-sulfato	3,6-An- α -D-Galp	G6S-DA

FONTE: Modificado de KNUTSEN *et al.* (1994)

As carragenanas constituintes da família *beta* (α , β , γ e δ) não apresentam sulfatação nas unidades **A**, enquanto as unidades **B** podem ser tanto 2-*O*-sulfatada, 6-*O*-sulfatada, 2,6-*O*-disulfatada ou não se apresentarem sulfatadas. Adicionalmente, as unidades **B** podem ser ciclizadas na forma de 3,6-anidrogactose (KNUTSEN *et al.*, 1994).

A família *lambda* (θ , λ , π e ξ) apresenta as unidades **A**, na forma de 2-*O*-sulfatada podendo ou não apresentar o substituinte acetal 4,6-*O*-(1-carboxietilideno), e as unidades **B** podem ser tanto 2-*O*-sulfatada, 6-*O*-sulfatada ou 2,6-*O*-disulfatada. A

carragenana do tipo *theta* (θ) é a única desta família a apresentar a unidade **B** ciclizada na forma de 3,6-anidrogactose (KNUTSEN et al., 1994).

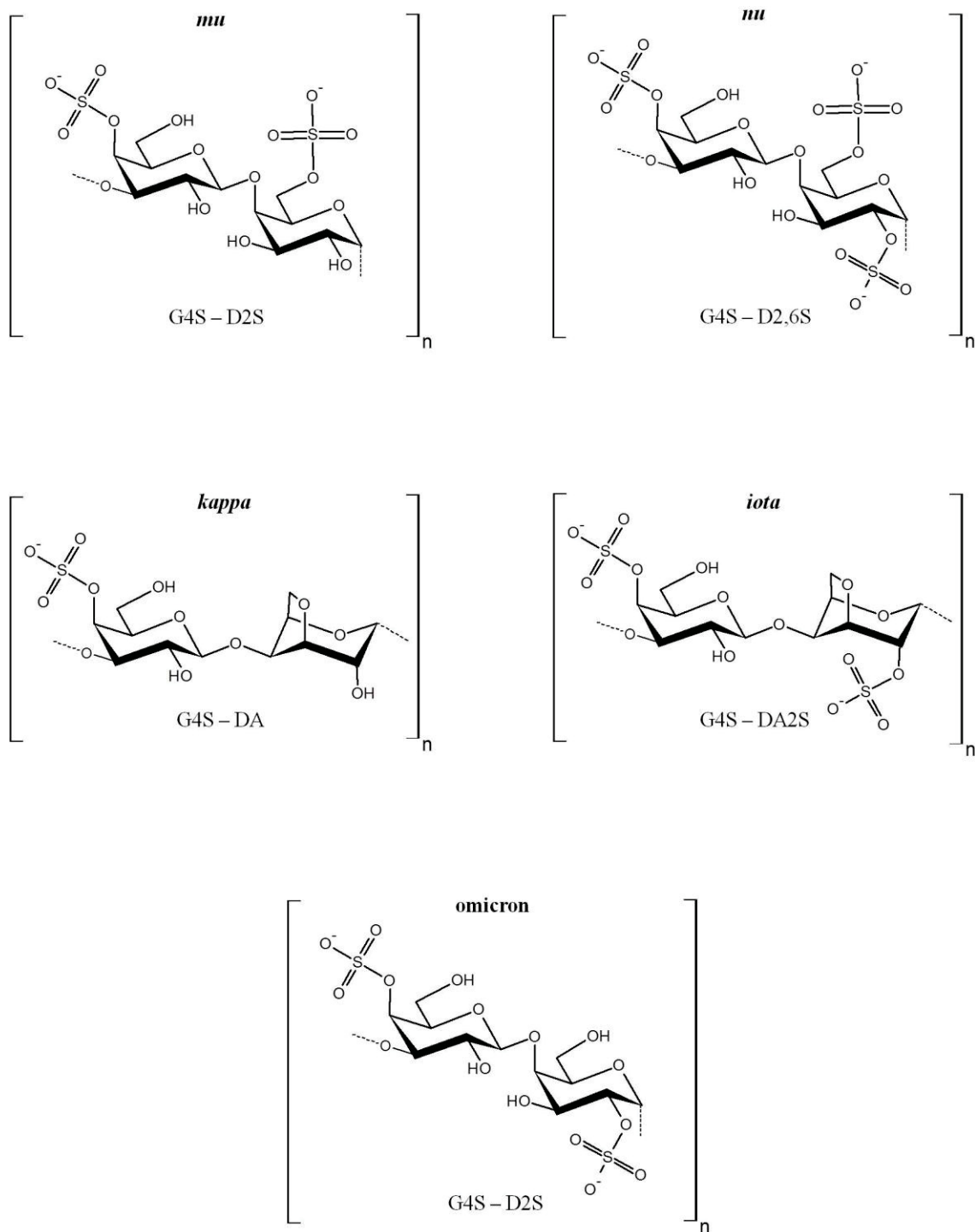
A família *omega* (ψ e ω) apresenta as unidades **A** como sendo 6-*O*-sulfatada. Enquanto carragenana do tipo *psi* (ψ) apresenta na unidade **B** a α -D-galactopiranosose 6-sulfato, a carragenana do tipo *omega* (ω) possui a 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (KNUTSEN et al., 1994).

As carragenanas pertencentes à família da *kappa* (k , i , μ ; v ; o) apresentam as unidades **A** 4-*O*-sulfatada, enquanto as unidades **B** podem estar tanto 2-*O*-sulfatada, 6-*O*-sulfatada ou 2,6-*O*-disulfatada, podendo ser encontradas na forma ciclizada (3,6-anidrogactose) ou não (α -D-galactopiranosose) (KNUTSEN et al., 1994). A FIGURA 2 demonstra as estruturas químicas das carragenanas desta família.

As carragenanas do tipo *mu* e *nu* são as precursoras das carragenanas do tipo *kappa* e *iota*, respectivamente. A conversão destas duas carragenanas é o resultado da formação de unidades 3,6-anidro- α -D-gactose (DA) a partir de unidades de α -D-gactose (D) sulfatadas no carbono-6. A formação do anel 3,6-anidro se dá de duas maneiras: *in vivo* na matriz celular pela ação de enzimas específicas, ou *in vitro* por meio de tratamento alcalino. Tanto as enzimas como o tratamento alcalino promove a liberação do grupo éster sulfato do carbono-6 e do hidrogênio da hidroxila do carbono-3, formando o anel 3,6-anidro (PERCIVAL, 1949; CIANCIA et al., 1993; USOV, 2011; NOSEDA; CEREZO, 1995).

Durante a formação da ligação 3,6-anidro, a unidade α -D-galactopiranosose que apresenta a conformação em cadeira 4C_1 (carbono-6 e o oxigênio do carbono-3 estão em posições equatoriais), passa a apresentar a conformação 1C_4 , onde tanto o carbono-6 como o oxigênio do carbono-3 estão em posições axiais, e próximos o suficiente para que ocorra a ligação covalente formando o anel 3,6-anidro (CIANCIA et al., 1993; DE RUITER; RUDOLPH, 1997; HARRINGTON et al., 2009).

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS CARRAGENANAS CONSTITUINTES DA FAMÍLIA *KAPPA*



FONTE: O autor (2018).

2.2.1 Estabilidade dos grupos éster de sulfato nas galactanas

As soluções de carragenanas são estáveis em pHs neutros ou alcalinos, entretanto em pHs ácidos e altas temperaturas, estas moléculas podem sofrer reações de dessulfatação e despolimerização.

Durante as reações de hidrólise parcial ou total das carragenanas, pode ocorrer hidrólise dos grupos éster de sulfato presente nas moléculas. Entretanto a labilidade do grupo sulfato (às condições ácida) depende das posições destes grupos na cadeia polissacarídica.

Durante a hidrólise redutiva parcial da *theta*-carragenana, a fim de produzir dissacarídeos e tetrassacarídeos alditóis, GONÇALVES e colaboradores (2005), observaram a completa dessulfatação em C2 das unidades de β -D-Galp, enquanto que C2 das unidades de 3,6-anidro-D-galactitol permaneceu sulfatada.

Resultado semelhante foi reportado por NOSEDA E CERREZO (1993), após realizarem auto-hidrólise da *lambda*- e *theta*-carragenana. Com 26 e 35 horas de auto-hidrólise da *lambda*-carragenana ainda era possível observar a presença tanto de unidades β -D-Galp 2-sulfato como β -D-Galp, e após 410 horas o espectro de RMN de ^{13}C mostrou ausência dos sinais referentes as unidades β -D-Galp 2-sulfato, indicando a perda total do sulfato. Adicionalmente, o sulfato em C2 das unidades de α -L-Galp 2,6-disulfato foram resistentes à condição ácida. De modo semelhante, a auto-hidrólise da *theta*-carragenana também causou a dessulfatação total em C2 das unidades de β -D-Galp. Além disto, o sulfato presente em C2 das unidades de 3,6-anidro- α -L-Galp também foi hidrolisado, entretanto em menor proporção que o sulfato em C2 das unidades vizinhas de β -D-Galp. Este resultado sugere que a hidrólise de grupos sulfato, apresenta diferentes susceptibilidades de hidrólise, ocorrendo de forma mais lenta em C2 das unidades 4-ligadas, que nas unidades 3-ligadas.

Adicionalmente, a hidrólise parcial redutiva da agarose 6-sulfato, para produzir a agarrabitol 6-sulfato, descrita por GONÇALVES e colaboradores (2005), demonstrou que o grupo sulfato em C6 das unidades de β -D-Galp 6-sulfato, não foi hidrolisado.

Da mesma forma, o grupo sulfato em C4 das unidades de β -D-Galp 4-sulfato, na *kappa*-carragenana, não foi hidrolisado durante reações de hidrólise parcial redutiva ou hidrólise ácida parcial (DUCATTI et al., 2011; GONÇALVES et al., 2005)

Estes resultados sugerem diferentes labilidades, dos grupos sulfato: a presença de ésteres de sulfato em hidroxilas secundárias equatoriais apresentam uma taxa de hidrólise maior que grupos sulfatos substituídos em hidroxilas axiais (REES, 1963).

2.2.2 Estabilidade das ligações glicosídicas nas galactanas obtidas das algas vermelhas

Algumas galactanas de algas vermelhas contêm aproximadamente cinquenta por cento de unidades 3,6-anidrogactose (*kappa*, *theta*, *iota* e *agarose*), que são extremamente sensíveis a condições ácidas severas, tipicamente utilizadas para hidrolisar outros tipos de estruturas de polissacarídeos (STEVENSON; FURNEAUX, 1990).

Na literatura são descritas reações de hidrólise utilizando diferentes tipos de carragenanas, como a: *iota*-(JOUANNEAU et al., 2010; STORTZ; CEREZO, 1991), *kappa*-(DUCATTI et al., 2011; GONÇALVES et al., 2010; YUAN et al., 2005), *theta*-(GONÇALVES et al., 2010) e *beta*-(FALSHAW; FURNEAUX; WONG, 2003) carragenana, originando diferentes oligossacarídeos.

LAWSON e REES (1968) utilizaram duas metodologias para produzir oligossacarídeos a partir da *lambda*-carragenana, acetólise e hidrólise parcial, respectivamente. Os autores observaram que as ligações α -(1 \rightarrow 3) foram clivadas preferencialmente pela hidrólise parcial, enquanto que as ligações β -(1 \rightarrow 4) foram clivadas através da acetólise. Além disto, verificou-se que velocidade de hidrólise das ligações α -(1 \rightarrow 3) é muito maior que as das ligações β -(1 \rightarrow 4). Indicando que a hidrólise parcial favorece a quebra das ligações α -(1 \rightarrow 3) preservando as demais ligações glicosídicas da molécula.

Outros fatores que influenciam a estabilidade das galactanas são a presença das unidades 3,6-anidro-Galp e os grupos éster de sulfato. Comparando as taxas de hidrólise de três carragenanas: *kappa* (G4S-DA) e a *iota* (G4S-DA2S) que apresentam unidades de 3,6-anidro-Galp, e da *lambda* (G2S-D2S6S) desprovida da unidade 3,6-anidro-Galp, SINGH E JACOBSSON (1994), observaram uma taxa de hidrólise mais lenta para a *lambda* quando comparada a *kappa*, devido ausência da unidade 3,6-anidro-Galp. GUISELY e colaboradores (1980), reportaram uma estabilidade a hidrólise ácida maior da *iota*, do que a apresentada pela *kappa*. Esta menor taxa de hidrólise da *iota* é atribuída à presença do grupo sulfato em C2 da unidade 3,6-anidro-Galp.

Desta forma a hidrólise parcial é uma maneira eficiente de obter oligossacarídeos sulfatados a partir das galactanas que contêm unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranoose, porque as ligações glicosídicas destas unidades são significativamente mais lábeis em meio ácido que as das β -D-galactopiranoose.

2.2.3 Produção de oligossacarídeos a partir de hidrólise ácida parcial de galactanas

Oligossacarídeos de galactanas podem ser obtidos através de hidrólises redutivas parciais ou hidrólises ácidas parciais.

Hidrólise parcial redutiva – A hidrólise ácida branda é realizada em presença do borano 4-metilmorfolina, um agente redutor estável em meio ácido. A reação ocorre com a quebra seletiva das ligações alfa (1 \rightarrow 3) das unidades de 3,6-anidrogactose (devido ao ácido e a temperatura). Após a quebra das ligações o borano 4-metilmorfolina reduz as extremidades redutoras dos oligossacarídeos produzindo unidades 3,6-anidrogactitol. O derivado 3,6-anidrogactitol é mais estável que o seu derivado redutor em condições ácidas (USOV; ELASVILI, 1991; STEVENSON; FURNEAUX, 1990).

GONÇALVES (2005) produziram e isolaram a partir da hidrólise redutiva parcial (TFA 0,5 mol.L⁻¹; 8 h; 65 °C) de *kappa*-carragenana os oligossacarídeos carrabiitol 4²-sulfato e carrabiitol 4², 4⁴-disulfato, respectivamente KA e KB. Adicionalmente também foram produzidos e isolados os oligossacarídeos carrabiitol 2¹-sulfato (TA) e carrabiitol 2¹, 2³-disulfato (TB), a partir da *theta*-carragenana. Entretanto foram necessários 4 horas a mais de hidrólise, quando comparado as condições utilizadas para a *kappa*-carragenana. A maior estabilidade da ligação alfa-glicosídicas na *theta*-carragenana foi atribuída a presença do grupo sulfato em C2 das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranoose. As estruturas químicas de KA, KB, TA e TB estão representadas na FIGURA 3.

Hidrólise parcial ácida – A hidrólise ácida parcial quebra seletivamente as ligações alfa das unidades de 3,6-anidrogactose. Em condição de hidrólise branda (concentração do ácido, baixas temperatura e tempo de reação) são produzidos oligossacarídeos pares com unidades de 3,6-anidrogactose como terminais redutores (STEVENSON; FURNEAUX, 1990)(HAMA et al., 2010). Se as condições de hidrólise forem mais drásticas, ocorre a degradação das unidades de 3,6-anidrogactose,

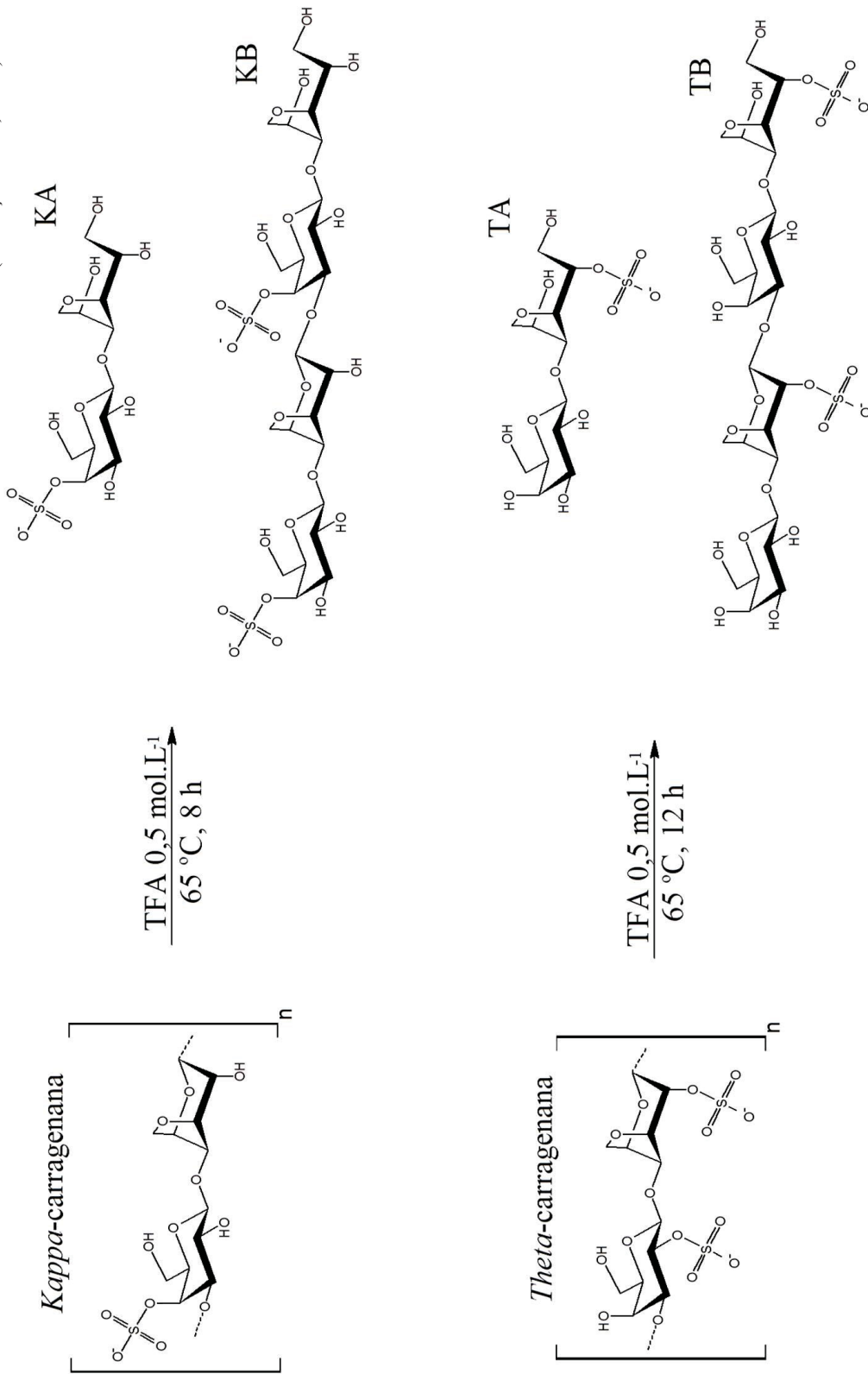
produzindo oligossacarídeos ímpares com unidades de galactose como terminais redutores (YU et al., 2002);

DUCATTI e colaboradores (2011) produziram e isolaram a partir da *kappa*-carragenana os oligossacarídeos carrabiose 4²-sulfato (Ka) e carrabiose 4², 4⁴-disulfato (Kb) por hidrólise parcial ácida (TFA 0,1 mol.L⁻¹; 3 h; 65 °C). As estruturas químicas estão demonstradas na FIGURA 4.

FIGUEIREDO, 2013, produziu e isolou três oligossacarídeos alditóis, a partir da hidrólise parcial ácida (TFA 0,1 mol.L⁻¹; 3 h; 65 °C) de *kappa*-carragenana. Após a hidrólise ácida parcial, os oligossacarídeos redutores foram convertidos a oligossacarídeos alditóis, através da redução das extremidades redutoras com borohidreto de sódio (NaBH₄), produzindo: carrabitol 4²-sulfato (F-K2), carrabitol 4², 4⁴-disulfato (F-K4) e carrabitol 4², 4⁴, 4⁶-trisulfato (F-K6). As estruturas química dos oligossacarídeos alditóis estão demonstrada na FIGURA 5.

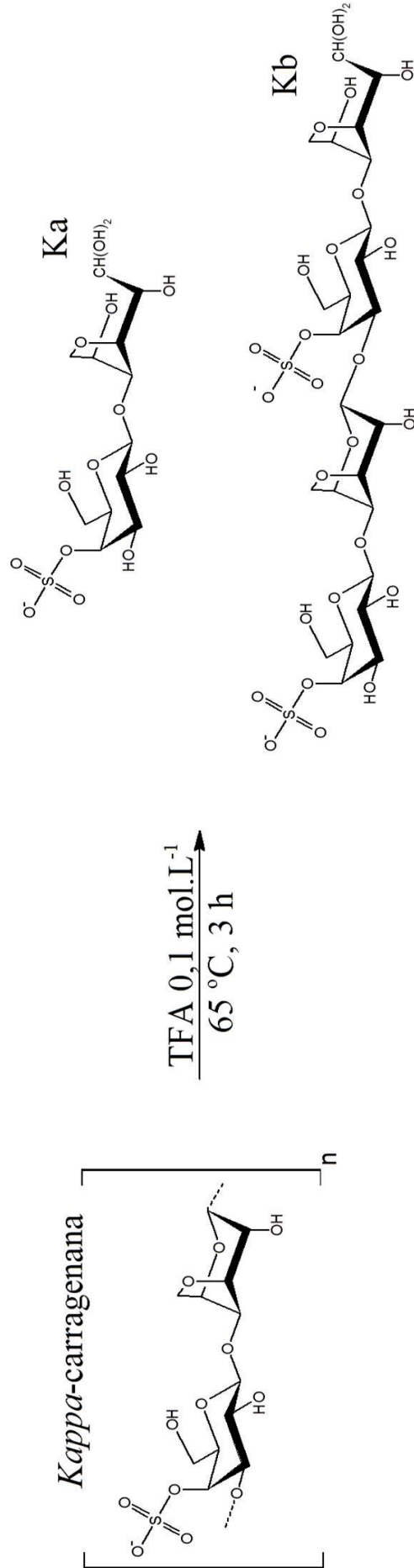
YU e colaboradores (2002) produziram oligossacarídeos redutores a partir da *kappa*-carragenana, sob a condição de parcial (HCl 0,1 mol.L⁻¹; 3 h; 65 °C). Foram obtidos: pentassacarídeos (Pen), heptassacarídeos (Hep) e undecassacarídeos (Und), contendo unidades de D-galactopiranosose 4-sulfato tanto nas extremidades redutoras como nos terminais não redutores, como demonstrado na FIGURA 6.

FIGURA 3 – PRODUTOS DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DE *KAPPA*- E *THETA*-CARRAGENANA (GONÇALVES, 2005)



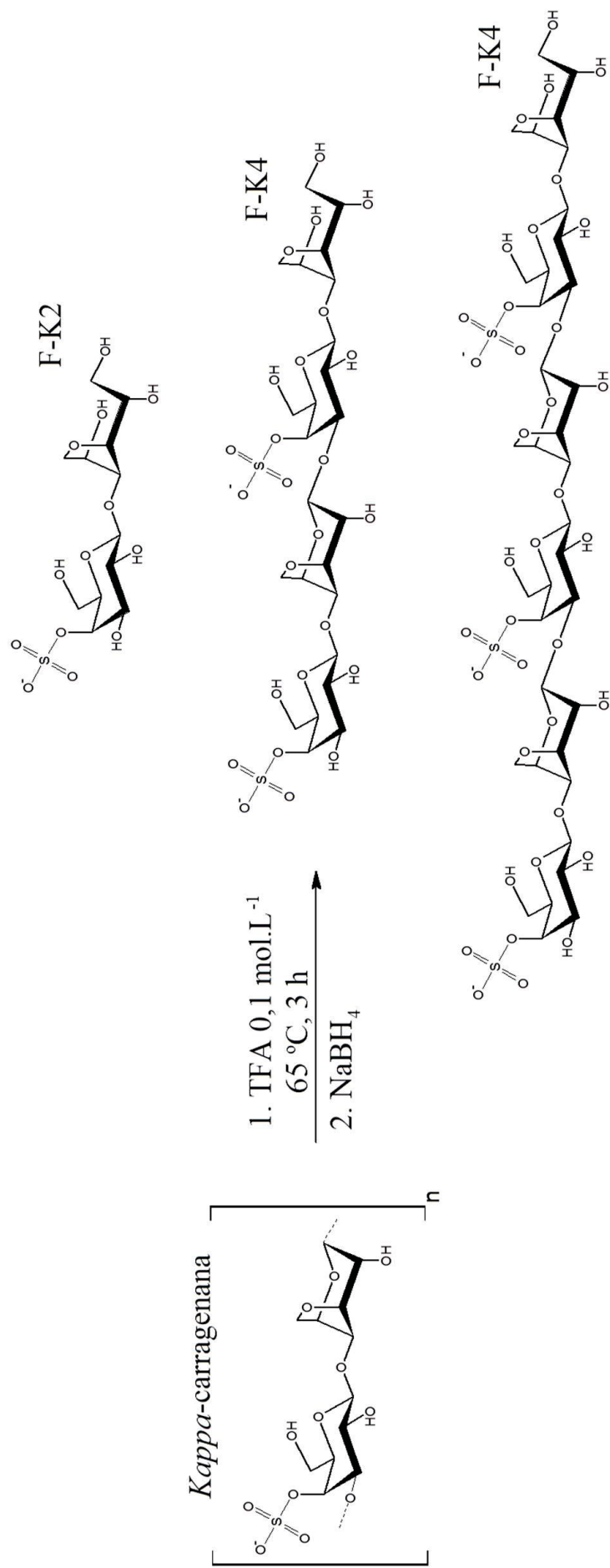
FONTE: O autor (2018)..

FIGURA 4 – PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE *KAPPA*-CARRAGENANA (DUCATTI et al, 2011)



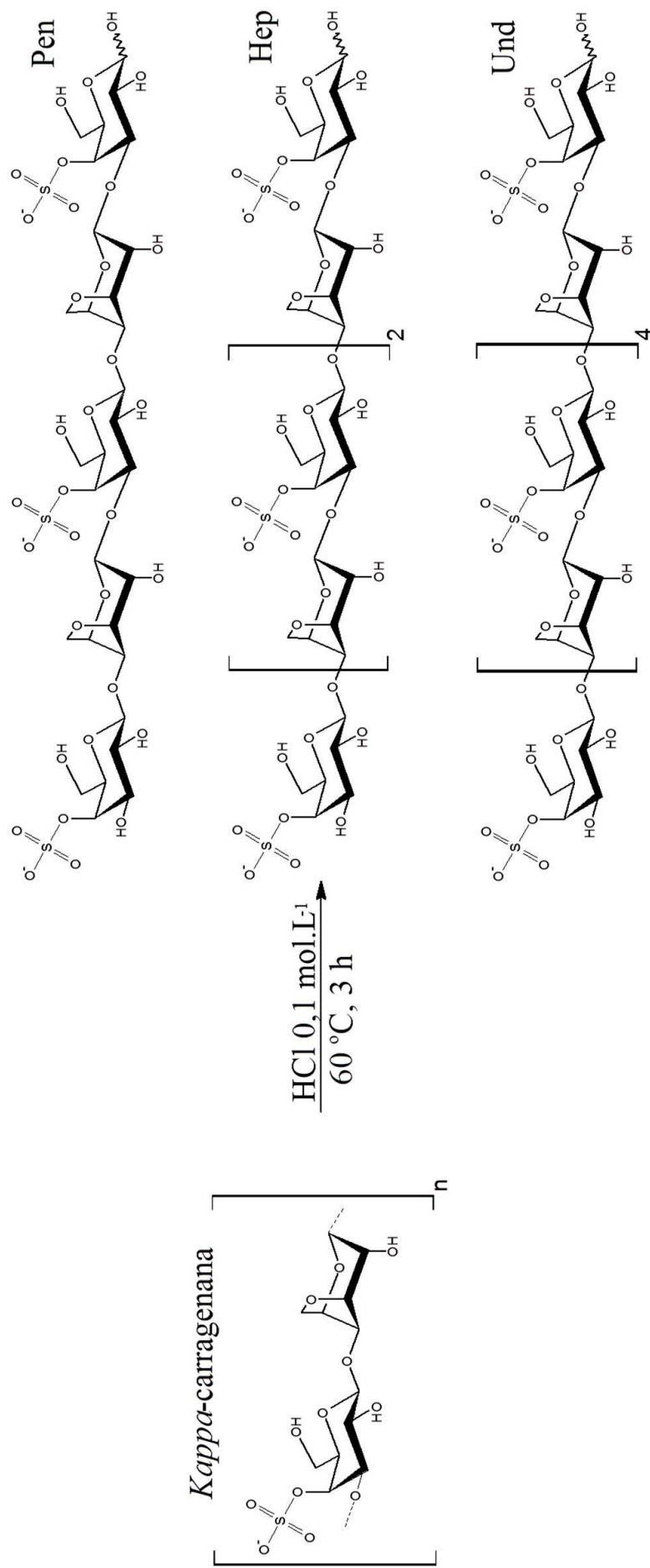
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 5 – PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA *KAPP4*-CARRAGENANA (FIGUEIREDO, 2013)



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 6 – PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA *KAPP4*-CARRAGENANA (YU et al., 2002)



FONTE: O autor (2018).

2.2.4 Aplicação e produção das carragenanas

Devido à capacidade de formar soluções viscosas e/ou gelificantes (hidrocolóides) as carragenanas do tipo *kappa*, *iota* e *lambda*, apresentam importante participação econômica em diversos setores industriais, sendo amplamente utilizadas na indústria de alimentos, como espessantes, gelificantes e agentes estabilizadores (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013; SAHA; BHATTACHARYA, 2010). Adicionalmente, as carragenanas vêm sendo aplicadas nas mais diversas áreas: farmacêutica (carregadores de drogas e compostos bioativos) (KAVOOSI et al., 2018; LI et al., 2014); engenharia de tecidos (regeneração de cartilagens) (ROCHA et al., 2011; POPA et al., 2015); e como biossensores (CAMPANELLA et al., 2004; ESMAEILI; HENG; LING, 2015; OOI; HENG; MORI, 2015).

As carragenanas do tipo *kappa*, podem ser obtidas principalmente a partir de espécies de macroalgas como *Kappaphycus alvarezii* e *Hypnea musciformis*, enquanto de *Eucheuma denteculatum* é a principal produtora de *iota*-carragenana (BIXLER, 1996; SANTOS, 1989; VAN DER VELDE et al., 2002) As macroalgas das espécies *Gigartina skottsbergii* e *Chondrus ocellatus* produzem principalmente *lambda*-carragenana (NOSEDA; CERESO, 1993; VAN DER VELDE et al., 2002; ZHOU et al., 2004).

Devido ao crescimento do consumo de carragenanas pela indústria, o mercado global de carragenanas foi avaliado em 2016 em aproximadamente USD 762,35 milhões, onde cerca de 13,3% deste total é correspondente ao mercado global de hidrocolóides aplicado à indústria de alimentos e bebidas.

Como consequência do aumento da demanda de matéria prima, estas macroalgas passaram a ser cultivadas em fazendas marinhas. A produção da *Kappaphycus alvarezii* representa 73% do consumo mundial, seguida pela *Eucheuma denticulatum* com 20%, tendo a maior parte dos cultivos realizados na Ásia (72%). A Indonésia e Filipinas são os países que mais praticam a aquicultura marinha de *Kappaphycus alvarezii*, coletando entre 110000 e 55000 toneladas de algas secas, respectivamente (PORSE; RUDOLPH, 2017).

Nos países da Ásia, a aquicultura tornou-se um meio de subsistência nas comunidades costeiras, gerando renda para milhares de famílias (HURTADO et al., 2001). Desta forma, muitos países tropicais, que apresentam faixas litorâneas, estão cultivando algas marinhas, como uma alternativa sustentável. Países como Venezuela

(RINCONES e RUBIO, 1999) e Brasil (PAULA et al., 2002) introduziram o cultivo da macroalga *K. alvarezii* na América do sul, a fim de avaliar a viabilidade de produção de biomassa para a indústria de carragenana.

No Brasil, a *K. alvarezii* foi cultivada pela primeira vez em 1995, em Ubatuba, São Paulo, com autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), tendo como objetivo avaliar os impactos ambientais e a viabilidade de cultivo destas algas, na tentativa de minimizar a exploração dos bancos naturais de *H. musciformis*, principal fonte de carragenana no Brasil, além de diminuir a dependência de matéria prima importada (CASTELAR; REIS; BASTOS, 2009; PAULA et al., 2002).

Em 1998, os cultivos foram levados à Ilha Grande, Rio de Janeiro, com o intuito de desenvolver cultivos em pequena escala. Somente em 2004 os cultivos começaram a ser produzidos em escalas comerciais (CASTELAR; REIS; BASTOS, 2009). Entretanto, o Brasil não é auto suficiente na produção das carragenanas, sendo desembolsados em 2014 aproximadamente US\$ 21 milhões na importação da matéria prima (EPAGRI, 2016).

2.2.5 Propriedades biológicas das galactanas e seus produtos de hidrólise

Além das propriedades gelificantes que resultam em inúmeras áreas de aplicação destes materiais, as carragenanas apresentam importantes atividades biológicas e/potenciais aplicações na área biomédica como por exemplo: anticoagulante (DE ARAUJO et al., 2013), antitrombótica (SOUZA et al., 2018), antiviral (S.F-TISCHER et al., 2006), antitumoral (YUAN et al., 2005) e imunomoduladora (ZHOU et al., 2004). Estas propriedades biológicas apresentadas pelas carragenanas, se devem principalmente devido a presença dos grupos éster de sulfato, os quais conferem caráter aniônico. Sugere-se que estas moléculas carregadas negativamente interajam com as cargas positivas presente em proteínas, o que explicaria suas atividades biológicas (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

Adicionalmente, estudos tem reportado a potencial atividade anti-HIV das carragenanas, devido a interferencia causada por estes compostos na fusão das células infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) além de inibirem a enzima retroviral específica (transcriptase reversa – *specific retroviral enzyme reverse transcriptase*). Entretanto, apesar dos estudos apresentarem grandes pontenciais contra

o HIV, a propriedade anticoagulante das carragenanas são consideradas reações adversas, apesar de não serem utilizadas como drogas terapêuticas (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

Recentemente, a *kappa-carragenana* foi avaliada quanto sua atividade antimicrobiana e antitumoral *in vitro*. A carragenana apresentou ação antibacteriana e antifúngica contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, respectivamente. Além disto, não promoveu efeito citotóxico contra linhagem de células de câncer de mama (MCF-7) e neuroblastoma humano (SH-SY5Y). No entanto foram observadas reduções significativas na capacidade de proliferação celular destas células tumorais em presença da carragenana sugerindo que a *kappa-carragenana* apresenta atividade antimicrobiana e antitumoral (SHEN et al., 2018).

ZHOU e colaboradores (2004), despolimerizaram a *lambda-carragenana* através de reação em microondas, obtendo cinco produtos de massa molecular distintas (650×10^3 , 240×10^3 , 140×10^3 , 15×10^3 e $9,3 \times 10^3$ g.mol⁻¹), que foram avaliadas *in vivo* (camundongos) a fim de se investigar a inibição de tumor (S180 e H22). As cinco amostras de carragenana apresentaram atividade antitumoral e de imunomodulação em diferentes graus. Adicionalmente, as amostras de Mw 15 e $9,3 \times 10^3$ g.mol⁻¹, apresentaram as taxas mais altas de inibição dos tumores, 66,1 e 68,9%, respectivamente, nas doses de 200 mg kg⁻¹ por dia. Desta forma concluiu-se que moléculas de menores massas moleculares de *lambda-carragenana*, provavelmente apresentam um benefício para atividades antitumorais.

Além disto WANG e colaboradores (2011) investigaram a capacidade de oligossacarídeos derivados da *kappa-carragenana*, em inibir a replicação do vírus da gripe A (H1N1) *in vitro*. Foram testados três oligossacarídeos de massa moleculares diferentes (2×10^3 , 3×10^3 e 5×10^3 g.mol⁻¹) Os resultados indicaram que o oligossacarídeo de menor massa molecular (2 kDa), foi o mais ativo, inibindo a replicação do vírus, com concentração inibidora de 90% (IC90) de 215 µg.mL⁻¹.

2.3 POLIURONÍDEOS SINTETIZADOS POR ALGAS PARDAS

Algas pertencentes ao filo *Phaeophyta* representam aproximadamente 2040 espécies, quase todas de origem marinha. Predominam em mares de regiões temperadas frias e polares, podendo ser encontradas em menores quantidades em mares tropicais (ALGAEBASE, 2017; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas pardas possuem variações em seus tamanhos, indo de alguns milímetros, até mais de 60 metros de comprimento. As algas pardas gigantes formam florestas marinhas densas conhecidas como *Kelps*, presentes a mais de 30 metros de profundidade, em águas claras, frias e ricas em nutrientes, fornecendo um habitat para outros organismos marinhos, como algas bentônicas, invertebrados e/ou mamíferos marinhos, sendo um dos ecossistemas mais dinâmico do mundo (MARINS et al., 2012; TYMON et al., 2017).

As florestas de *Kelps* distribuem-se pelo mundo todo em mares temperados e frios. As algas do gênero *Laminaria* destacam-se como o gênero mais frequente, distribuídas principalmente, na China e Japão, sendo encontradas no Oceano Pacífico Norte a partir do Japão, nordeste da costa do Alasca até o norte da Califórnia (Estados Unidos) (LIU et al., 2017b; PENG et al., 2018). As algas do gênero *Ecklonia* estão distribuídas pela Austrália e Nova Zelândia, enquanto a *Macrocystis* domina as florestas de algas ao longo das costas ocidentais da América do Norte e do Sul, e alguns locais da África do Sul, Austrália e Nova Zelândia (TYMON et al., 2017; VUONG et al., 2017). No Brasil são encontrados exemplares de *Laminaria brasiliensis*, na região que se estende de Cabo Frio (Rio de Janeiro) até o sul da Bahia (DUARTE; GORIN; DUARTE, 1991).

Das macroalgas marinhas pertencentes a este grupo, podem ser extraídos polissacarídeos intracelulares mucilaginosos, denominados ácido algínico, os quais podem representar até 40% de massa seca destas algas. Dentre as macroalgas pardas, a *Macrocystis pyrifera* fornece um dos maiores teores de alginato por peso seco de alga (aproximadamente 45%), enquanto a *Laminaria hyperborea* fornece uma dos menores teores aproximadamente (13%) (SCHIENER et al., 2015; WESTERMEIER et al., 2012; PERCIVAL; MCDOWELL; 1967).

2.3.1 Ácido algínico

O ácido algínico é o principal polissacarídeo isolado das algas marrons (Filo Phaeophyta). O ácido alginício é um poliuronídeo constituído por unidades de 4-*O*- β -D-manopiranosídurônico e 4-*O*- α -L-gulopiranosídurônico. Estes monossacarídeos estão distribuídos ao longo da cadeia polissacarídica, gerando regiões de ácido β -D-manurônico (M) ou ácido α -L-gulurônico (G), na forma de blocos homopoliméricos (BM e BG, respectivamente), ou regiões intercaladas com os dois monômeros,

formando blocos heteropoliméricos ou mistos (BGM), como demonstrado na FIGURA 7 (HAUG; LARSEN; SMIDSRØD, 1967).

Os monômeros M e G apresentam diferentes disposições espaciais, a fim de adquirirem uma posição mais favorável energeticamente. Desta forma, as unidades de ácido β -D-manurônico constituintes dos blocos BM estão na posição de cadeira 4C_1 com ligações glicosídicas diequatoriais $\beta(1\rightarrow4)$, enquanto as unidades de ácido α -L-gulurônico dos blocos BG, apresentam-se na posição de cadeira 1C_4 , com ligações glicosídicas diaxiais $\alpha(1\rightarrow4)$ (DUNFIELD; WHITTINGTON, 1974). Esta diferença conformacional leva os polimanurônicos a se organizarem em estruturas planas como fita, enquanto os poligulurônicos formam estruturas semelhantes a hastes (DAVIS; VOLESKY; MUCCI, 2003).

Devido à insolubilidade do ácido algínico em água e seu caráter aniônico, é possível transforma-lo em sais solúveis com os cátions monovalentes (Na^+ , K^+ e amônio), entretanto os sais de alginato divalentes e polivalentes merecem atenção especial, pois apresentam a capacidade de formarem retículos iônicos, e consequentemente hidrogéis (NAKAMURA et al., 1995).

A reticulação iônica resulta de ligações iônicas que ocorrem entre as carboxilas do polissacarídeo e os cátions divalentes ou polivalentes, de modo que o cátion se aloja entre as cadeias poliméricas, levando a formação de uma rede polimérica. Adicionalmente, a reticulação iônica no ácido algínico ocorre apenas nos monômeros G, devido à disposição espacial das unidades de 4-*O*- α -L-gulopiranosidurônico, serem mais favoráveis (CENSI et al., 2012).

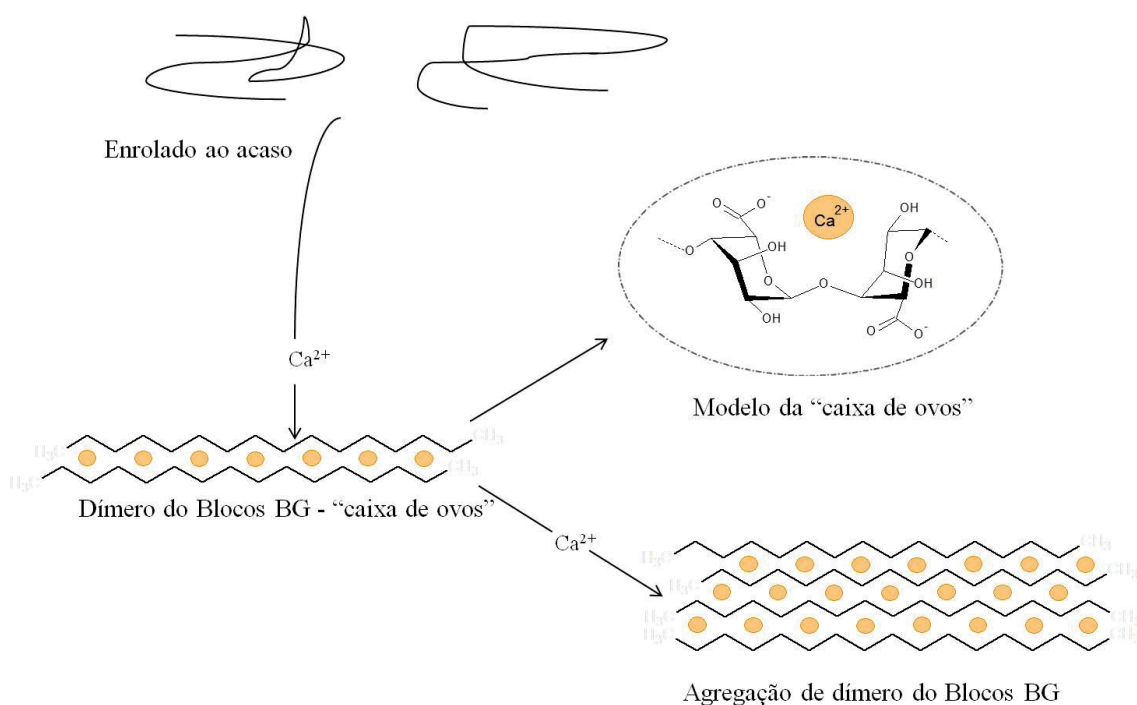
Desta maneira, cátions divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+}) ficam alojados entre os monômeros G e as cadeias dos polímeros, gerando uma estrutura em forma de rede, regular e similar a uma “caixa de ovos”, como representado na FIGURA 8 usando como exemplo o íon cálcio (CENSI et al., 2012; GRANT et al., 1973; MORRIS et al., 1978). Entretanto os géis formados pelas reticulações iônicas podem ser facilmente dissociados através do processo de perda dos íons divalente para o meio, devido às trocas íons com cátions monovalentes (LEE; MOONEY, 2012).

As propriedades mecânicas e físicas dos hidrogéis (porosidade, capacidade de intumescimento, biodegradabilidade, estabilidade, resistência mecânica e biocompatibilidade) são determinadas pela estrutura química (proporções dos monômeros M e G e arranjo estrutural), massa molecular da cadeia polimérica, cinética de formação do gel, bem como da concentração e do tipo de íon utilizado, formando.

géis fortes o suficiente para serem utilizados em diversas aplicações biomédicas e industriais. Desta forma alginatos com maiores percentuais de ácido α -L-gulurônico formam géis mais rígidos e quebradiços, devido principalmente a propriedade de formação do modelo “caixa de ovos”, enquanto que os géis com maiores teores de ácido β -D-manurônico são mais viscoelásticos (GEORGE; ABRAHAM, 2006; GOH; HENG; CHAN, 2012); PERCIVAL; MCDOWELL; 1967; DRURY; MOONEY, 2003)

Adicionalmente, as diferentes proporções dos monômeros M e G nos alginatos, conferem diferentes propriedades biológicas. OTTERLEI e colaboradores (1991), avaliaram a capacidade dos alginatos e seus derivados (Blocos BM, BMG e BG), em estimular monócitos humanos a produzirem fator de necrose tumoral (alfa), interleucina-6 e interleucina-1. Como respostas, obtiveram que alginatos contendo alto percentual de monômeros M, possuem maior capacidade de estimular a produção de citocinas, facilitando respostas imunológicas, diferentemente dos alginatos com alto percentual de monômeros G.

FIGURA 8 – MODELO DA “CAIXA DE OVOS” NOS BLOCOS BG

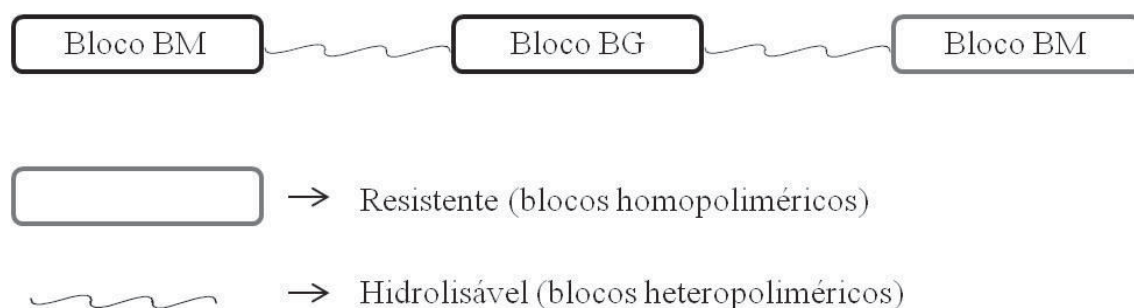


FONTE: Modificado de MORRIS et al., 1978.

2.3.2 Composição química de alginatos obtidos de diferentes espécies de macroalgas pardas

HAUG e colaboradores (1966a,b, 1974), iniciaram estudos sistemáticos com relação à variabilidade das sequências dos ácidos urônicos presentes em diferentes fontes de alginato, determinando as proporções M/G. HAUG e colaboradores (1966) propuseram um modelo para o ácido algínico (FIGURA 9), constituído por dois tipos de regiões, uma parte resistente (blocos homopoliméricos) e outra hidrolisável (blocos heteropoliméricos).

FIGURA 9 – MODELO DO ÁCIDO ALGÍNICO PROPOSTO POR HAUG E COLABORADORES (1966)

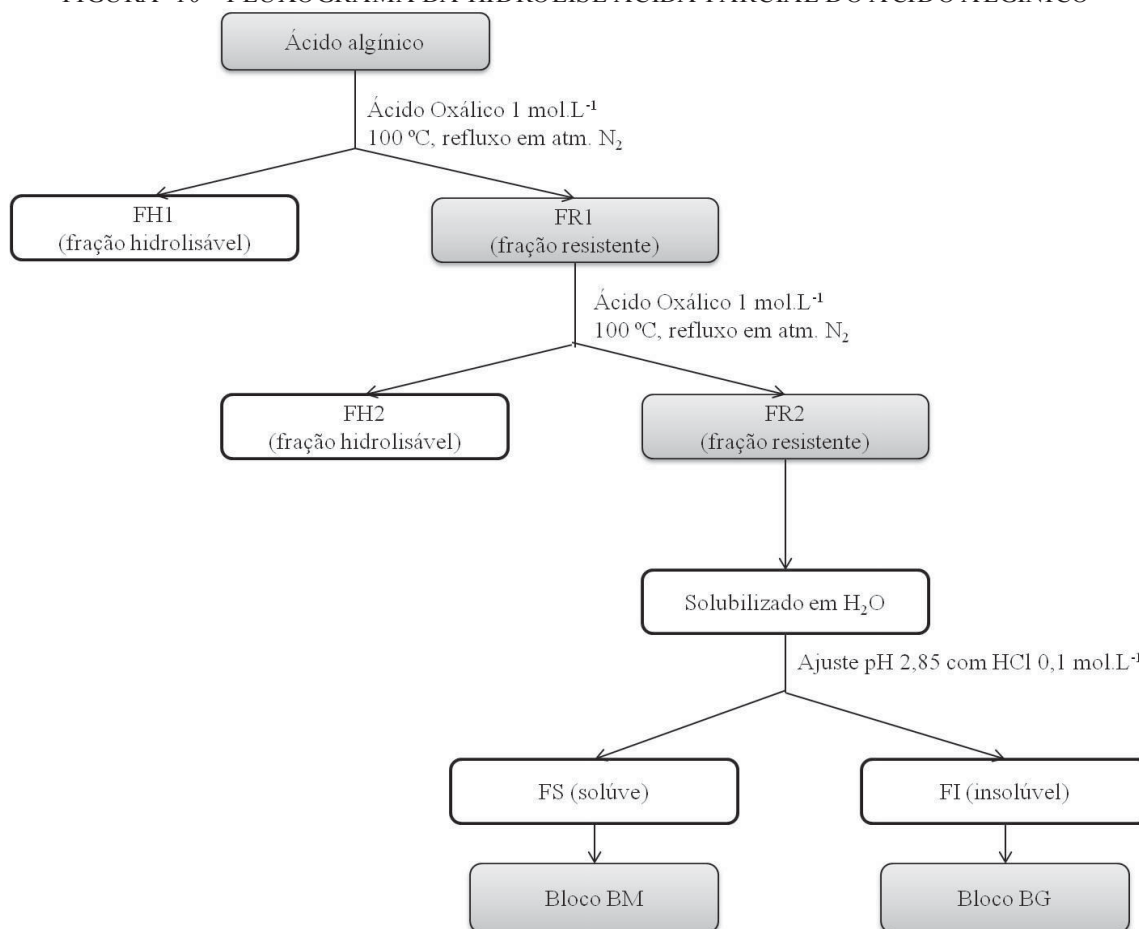


FONTE: Modificado de HAUG et al., 1966.

Quando o ácido algínico é submetido a hidrólise ácida parcial, utilizando ácido oxálico a 100 °C, uma fração fica insolúvel (blocos BM e BG) e outra solúvel (blocos BMG), sendo respectivamente as regiões resistentes e hidrolisáveis do polissacarídeo. A partir da fração insolúvel é possível realizar o fracionamento, em pH 2,85, dos blocos homopoliméricos BM (solúvel) e BG (insolúvel) que constituem o ácido algínico, COMO DEMONSTRADO NA figura 10. Através desta metodologia é possível obter produtos de hidrólise entre 80 e 90% de pureza (HAUG; LARSEN; SMIDSRØD, 1967a; HAUG; LARSEN; SMIDSRØD, 1974). Na FIGURA 11 estão representadas as estruturas químicas dos blocos BM e BG, sendo constituídos respectivamente por oligossacarídeos de 4-*O*-β-D-manopiranosídurônico e 4-*O*-α-L-gulopiranosidurônico.

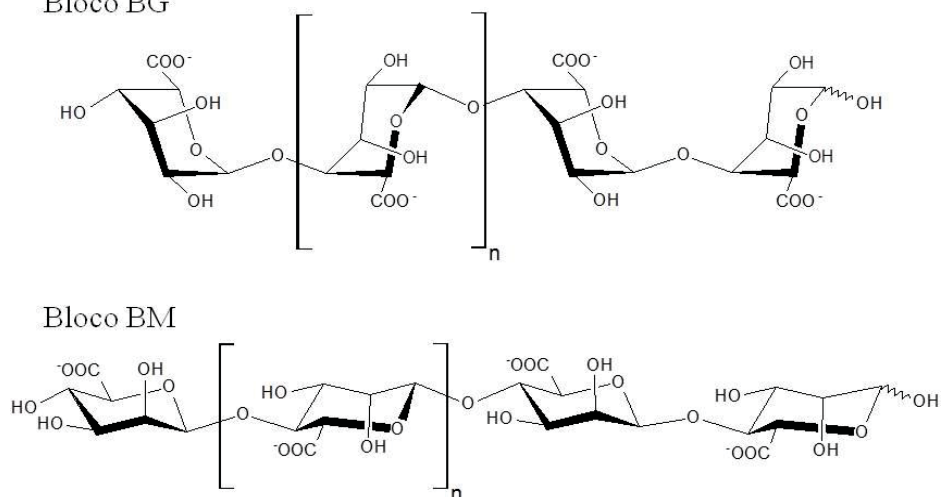
Desta forma HAUG e colaboradores (1974) observaram diferentes proporções M/G para os ácidos algínicos extraídos de diferentes espécies, coletadas em diferentes épocas e locais, indicando que a proporção das unidades M:G no ácido algínico varia conforme a espécie, habitat, idade, sazonalidade e parte da planta utilizada para extração (HAUG; LARSEN; SMIDSRØD, 1974; MILLER, 1974). A TABELA 2, apresenta alguns exemplos de ácidos algínicos extraídos de macroalgas pardas, e suas relações M/G determinadas através de metodologias de hidrólise parcial ácida.

FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DA HIDROLÍSE ÁCIDA PARCIAL DO ÁCIDO ALGÍNICO



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 11 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO BLOCO BM E BLOCO BG



FONTE: O autor (2018).

Desta forma HAUG e colaboradores (1974) observaram diferentes proporções M/G para os ácidos algínicos extraídos de diferentes espécies, coletadas em diferentes épocas e locais, indicando que a proporção das unidades M:G no ácido algínico varia

conforme a espécie, habitat, idade, sazonalidade e parte da planta utilizada para extração (HAUG; LARSEN; SMIDSRØD, 1974; MILLER, 1974). A TABELA 2, apresenta alguns exemplos de ácidos algínicos extraídos de macroalgas pardas, e suas relações M/G determinadas através de metodologias de hidrólise parcial ácida.

Para a mesma espécie *Laminaria digitata* coletada em diferentes países (Marrocos, França, Brasil e Noruega), foram obtidas diferentes relações dos monômeros M e G constituintes do ácido algínico, variando de 1,4 até 2,11.

De forma semelhante ocorreu para a alga *Laminaria hyperborea*, entretanto foram comparados as relações M e G, dos polissacarídeos extraídos de diferentes regiões da planta: frondes e estipes, apresentando 0,38 até 1,28, respectivamente.

Adicionalmente, quanto menor esta relação M/G, maior será a capacidade do ácido algínico em gelificar. Esta propriedade de gelificação torna este polímero um dos polissacarídeos (hidrocolóides) de grande importância na indústria. Entretanto pelo fato do ácido algínico ser insolúvel em água à temperatura ambiente, os sais de sódio, cálcio e potássio deste polissacarídeo, solúveis em água, são preferidos para o emprego na indústria de alimentos. Desta forma o alginato de sódio é o principal sal do ácido algínico, utilizado pela indústria.

TABELA 2 – RELAÇÃO M:G DE ÁCIDOS ALGÍNICOS OBTIDOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE MACROALGAS PARDAS

(continua)			
Espécie de macroalga	Relação M:G	Local de coleta	Referência
<i>Laminaria digitata</i>	2,11	Costa do Marrocos	FERTAH et al., 2017
<i>Laminaria digitata</i>	1,5	Costa da França	PAPAGEORGIOU, KOUVELOS e KATSAROS, 2008
<i>Laminaria brasiliensis</i>	1,4	Costa do Brasil	DUARTE; GORIN; DUARTE, 1991.
<i>Laminaria digitata</i>	1,6	-	GRASDALEN, LARSEN e SMIDSRØD, 1979.
<i>Laminaria digitata</i> ^a	1,5	Costa da Noruega	HAUG; LARSEN; SMIDSRØD, 1974
<i>Laminaria hyperborea</i> ^b	1,28	Costa da Noruega	HAUG; LARSEN; SMIDSRØD, 1974
(conclusão)			
Espécie de macroalga	Relação M:G	Local de coleta	Referência
<i>Laminaria hyperborea</i> ^c	0,38	Costa da Noruega	HAUG; LARSEN; SMIDSRØD, 1974

<i>Sargassum palladum</i>	1,5	-	NAI-YU et al., 1994.
<i>Sargassum thunbergii</i>	1,27	-	NAI-YU et al., 1994.
<i>Sargassum kjellmanianum</i>	1,22	-	NAI-YU et al., 1994.
<i>Macrocystis pyrifera</i>	1,17	Patagônia, Argentina	GOMEZ et al., 2009.
<i>Dictyopteris delicatula</i>	0,86	Costa do Brasil	FLORENTIN, 2015.

^a corresponde a macroalga coletada em janeiro; ^b correspondem as macroalgas coletadas em fevereiro além do ácido alginico ter sido extraído das frondes e das estipes, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

2.3.3 Aplicação e produção do alginato

O alginato é utilizado em diversas áreas devido a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Na indústria de alimentos é utilizado como espessante e estabilizante, como na elaboração de sucos, mantendo os constituintes da mistura em suspensão. Na indústria têxtil, tem o papel de melhorar o desempenho das tintas utilizadas nos processos de impressões, favorecendo desta forma a aderência e a deposição das cores sobre os tecidos. Na cosmética, é utilizado na preparação de pomadas e suspensões (DRAGET; TAYLOR, 2011; HAY et al., 2013; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; ONSØYEN, 1996).

Adicionalmente, o alginato vem sendo muito empregado em outros setores industriais, como: engenharia de tecido (regeneração de cartilagens) (DIDUCH et al., 2000; STAGNARO et al., 2018), suporte para imobilização de enzimas (KIM et al., 2017) e na indústria farmacêutica (transportadores de drogas e compostos bioativos) (RAMOS et al., 2017). Desta maneira o alginato é um importante recurso para diversos setores industriais, além disto a demanda por produção de alginato veem aumentando nos últimos anos, e é provável que aumente ainda mais no futuro, particularmente para seu uso em aplicações biomédicas e de bioengenharia em todo o mundo (BIXLER; PORSE, 2011; PETEIRO, 2018).

Atualmente, a produção global de alginatos oriunda da exploração de apenas 9 espécies de algas marinhas, dentre as quais destacam-se os pertencentes ao gênero *Lessonia*, *Laminaria* e *Saccharina*, representando 86% da produção mundial de alginato. Entretanto mais de 80% dessas algas são colhidas de populações nativas, e apenas 20% são fornecidos através de cultivos marinhos realizados na Ásia (China,

Japão e Coréia), principalmente das *Saccharina*. Mais de 8,0 milhões de toneladas de algas foram cultivadas e colhidas em 2014 com um valor de cerca de 1,4 bilhões de dólares anuais (BIXLER; PORSE, 2011; PETEIRO, 2018).

O desenvolvimento da aquicultura nos países asiáticos recebeu incentivo dos governos para atender a demanda de consumo humano, pois os recursos naturais eram insuficientes. Entretanto em países europeus e americanos, a prática de cultivo foi iniciada nos anos 90 e 80, a fim de se estudar a viabilidade dos cultivos. As pesquisas demonstraram ser tecnicamente, biologicamente e financeiramente viáveis além de apresentarem baixos custos, porém não despertaram interesse na época, já que os estoques nativos de algas eram suficientes para atender a demanda comercial e financeiramente mais rentáveis (DRUEHL et al., 1988; PÉREZ; KAAS, 1984; PETEIRO, 2018). No entanto, atualmente vem crescendo o interesse no desenvolvimento e otimização do cultivo destas algas nestes países, devido ao aumento da demanda do material oriundo destas espécies para diferentes usos comerciais com alto valor agregado, além da importância ambiental (BUSCHMANN et al., 2014; PETEIRO, 2018; PETEIRO; SÁNCHEZ; MARTÍNEZ, 2016).

2.3.4 Propriedades biológicas do alginato e seus produtos de hidrólise

O alginato é o biopolímero mais utilizado para sistemas de encapsulamento. No caso do encapsulamento de probióticos, que são organismo vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício para saúde do hospedeiro. Entretanto é necessário que estes organismos sobrevivam a passagem através do trato digestório, chegando vivos até o local onde irão agir, sendo extremamente necessário proporcionar uma barreira de proteção, sendo encapsulando com polissacarídeos inertes. RAMOS e colaboradores (2017) testaram alginatos com diferentes massas moleculares e diferentes relações de M/G, no processo de encapsulamento do probiótico *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (LLC), para proteção desta bactéria contra as condições drásticas do sistema digestivo. As esferas geradas foram testadas em digestões *in vitro*, simulando o sistema gastrointestinal. Os autores relatam que alginatos de baixa massa molecular e baixa relação M/G, produzem esferas mais organizadas e menos permeáveis, garantindo assim a alta viabilidade dos probióticos.

Adicionalmente, o alginato vem sendo utilizado na engenharia de tecidos, no processo de regeneração de cartilagens. Muitos pacientes em hospitais necessitam de algum tipo de procedimento envolvendo reconstrução de cartilagem, pois a cartilagem apresenta uma capacidade de regeneração limitada devido à ausência de vasos sanguíneos e à baixa potência mitogênica dos condrócitos, regenerando-se com dificuldade e de modo incompleto, exceto em crianças de pouca idade (KRAAN et al., 2002). A reconstrução de estruturas com anatomias complexas (nariz, queixo, etc) é um desafio, pois a geometria única das estruturas faciais requer um alto grau de precisão na fabricação de implantes. A engenharia de tecidos vem como uma alternativa no processo de regeneração, pois através da semeadura de células em moldes de polímeros biodegradáveis personalizados, fornecem um ambiente tridimensional que pode promover a produção da matriz, de forma precisa predeterminada, e o alginato é utilizado neste processo, pois os hidrogéis deste polímero, tem se demonstrado eficazes transportadores de condrócitos na formação de cartilagens subcutâneas. CHANG e colaboradores (2001) prepararam moldes de implantes tridimensionais para formar cartilagens específicas com Silastic ERTV, e injetaram nestes moldes suspensões de condrócitos em 2% de alginato, gelificadas por misturas com CaSO_4 . Em seguida implantaram estas construções geleificadas com diferentes concentrações celulares (10, 25 e 50 milhões/mL), em camundongos. Eles observaram a formação progressiva de cartilagens com o tempo, além do aumento nos teores de proteoglicanos e de colágeno. Desta forma, este sistema pode ser útil na produção em larga escala de implantes de cartilagem de forma precisa.

Recentemente, um estudo centrado no papel dos alginatos na ingestão de alimentos foi realizado por EL KHOURY e colaboradores (2013). Os autores concluíram que os alginatos possuem um alto potencial na regulação da saciedade e níveis de glicemia quando suplementados com alimentos, apontaram que em comparação com outras fibras viscosas e gelificantes, os alginatos oferecem vantagens em relação às propriedades físicas, químicas, sensoriais e fisiológicas.

Adicionalmente, o alginato é amplamente utilizado na odontologia para produção de modelos em gesso, constituindo um recurso imprescindível no diagnóstico e planejamento odontológico, permitindo a visualização precisa da arcada dentária sob diferentes ângulos e posições. O alginato apresenta vantagens que possibilitem o seu uso como moldes, dentre eles se destacam o custo relativamente baixo, a facilidade de uso e de sua limpeza (ALVES-REZENDE et al., 2010).

Além disto, curativos com alginato de cálcio já são comercializados (Algoderm®; Curasorb®; Sorbalgon®; Tegagen®). Estes produtos são compostos por fibras de alginato de cálcio, que apresentam alta capacidade de absorção, resultando na troca iônica do cálcio do alginato, com o sódio do sangue e do exsudato. Estes materiais promovem a hemostasia, absorvendo o exsudato, formando um gel que mantém a umidade do ferimento. Elas são indicadas para feridas abertas, altamente exsudativas com ou sem infecção (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

Os curativos de feridas requerem boas propriedades anti-sépticas, resistência mecânica e serem feitos de materiais naturais que não causem problemas de contaminação por exemplo nas feridas agravando a lesão. Já é conhecida a atividade antimicrobiana dos íons cério e do polissacarídeo quitosana, bem como a eficiência dos curativos para feridas a base de alginato (disponíveis comercialmente). KAYGUSUZ e colaboradores (2017) resolveram unir as propriedades destes materiais produzindo dois tipos de filmes de alginato: um reticulado com solução de cério e outro reticulado com solução de cério e quitosana. Estes filmes produzidos foram testados quanto a propriedade antibacteriana, comparando com o filme convencional de alginato de cálcio. Tanto os filmes de alginato reticulado com íons de cério quanto os reticulados com íons de cério e quitosana apresentaram atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*). Entretanto os filmes de cério-alginato-quitosana apresentaram melhores resultados quando a atividade antimicrobiana, bem como melhores características físicas e de flexibilidade quando comparado aos outros filmes.

Outra potencial aplicação para o alginato está na biomedicina. VENKATESAN e colaboradores (2017) produziram e caracterizaram compósitos de alginato-quitosana-nanopartículas de prata (AgNPs) e avaliaram a citotoxicidade dos compósitos alginato-quitosana-AgNPs e alginato-quitosana contra células de câncer de mama MDA-MB-231. A viabilidade celular foi avaliada por 24 h utilizando diferentes proporções proporções de compósitos (1, 5 e 10 mg). Com a relação de 1 mg, nenhum dos compósitos mostrou qualquer efeito citotóxico, no entanto, quando utilizado 5 mg de composto de quitosano-alginato-AgNP, a viabilidade celular diminuiu em 70% enquanto o composto de quitosano-alginato não induziu citotoxicidade visível na relação de massa equivalente. O efeito citotóxico do composto de quitosano-alginato-AgNP foi ainda aumentado a 10 mg de concentração, onde 95% das células estavam mortas. Em contraste, o composto de quitosano-alginato, com a relação de 10 mg,

mostrou muito menos toxicidade, reduzindo a viabilidade celular em 40% após o tratamento. Desta forma as adições das AgNPs melhoram e proporcionam uma alta citotoxicidade destes compósitos de alginato-quitosana, frente a células cancerígenas.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos secundários do metabolismo celular, que podem induzir a danos nas estruturas celulares, como por exemplo o DNA. Os sistemas de defesa dos organismos apresentam maneiras diferentes de eliminar estas substâncias nocivas, entretanto não podem impedir totalmente os danos, sendo necessários o uso de antioxidantes sintéticos como por exemplo BHA e BHT (hidroxianisol butilato e hidroxitolueno butilado, respectivamente). Estes antioxidantes sintéticos apresentam restrição quanto ao uso devido os efeitos tóxicos, incentivando desta forma a busca e o desenvolvimento por novos compostos antioxidantes, que não apresentem toxicidade. UENO e colaboradores (2012) produziram blocos de BM e BG (polimanuronato e poliguluronato, respectivamente) a partir do alginato de sódio pelo processo de hidrólise parcial ácida (HAUG et al., 1966), e avaliaram os seus efeitos *in vitro* em células RAW264.7 quanto a atividade antioxidante e estimulante dos macrófagos murinos. Tanto os blocos BM como os blocos BG foram capazes de sequestrar o radical superóxido, de maneira dose-dependente.

Desta forma a introdução de determinados grupos seja por modificação química ou apenas a sinergia com outros materiais, altera, proporcional e/ou potencializa características físicas e biológicas do polímero original, despertando um grande interesse nos últimos anos pelo estudo das modificações químicas dos polissacarídeos.

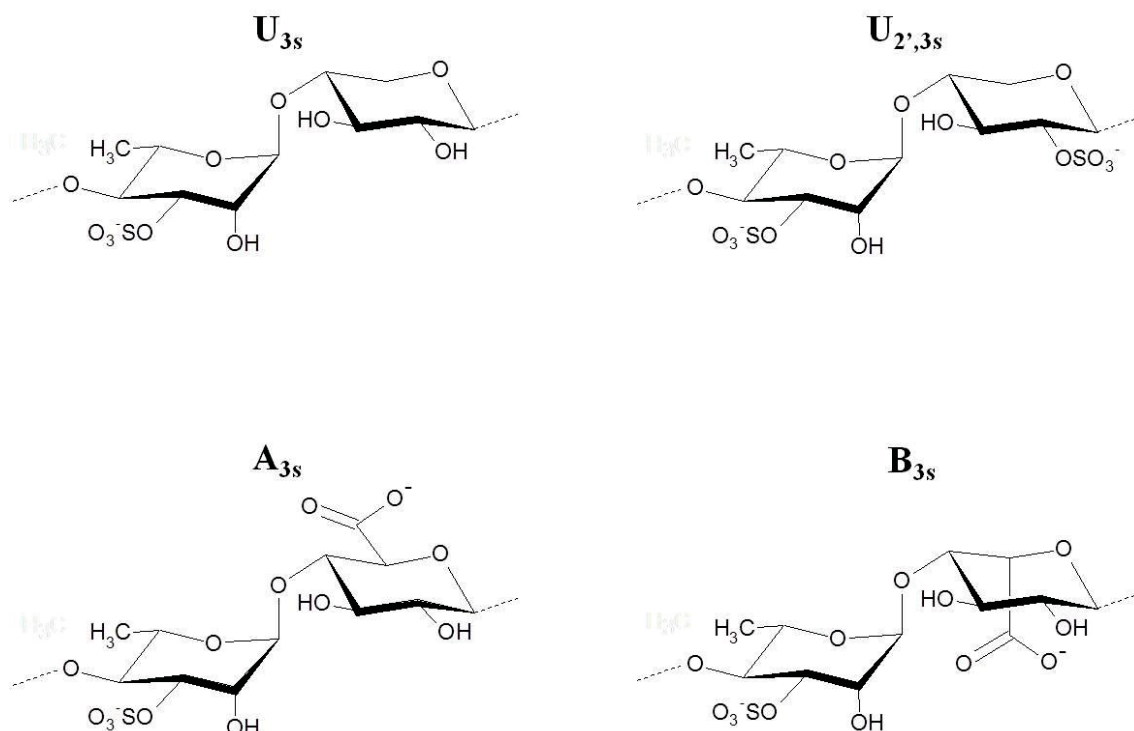
2.4 ULVANAS EXTRAÍDAS DE MACROALGAS VERDES

As macroalgas verdes estão presentes no filo Chlorophyta, com aproximadamente mais de 6300 espécies diferentes (AlgaeBase, 2017). A maior parte das algas verdes são oriundas de água doce, entretanto algumas classes como as *Prasynphoyceae*, *Charophyceae*, *Ulvophyceae* e *Chlorophyceae*, são predominantemente marinhas. Dentro da classe das *Ulvophyceae* se destacam as macroalgas do gênero *Ulva*, com aproximadamente 125 espécies distintas (GUIRY; GUIRY, 2017).

Os polissacarídeos presentes na matriz da parede celular destas macroalgas foram denominados por LAHAYE e AXELOS (1993) como ulvanas, e representam entre 8 e 29 % do peso seco da macroalga (ROBIC et al., 2009). As ulvanas, são heteropolissacarídeos sulfatados complexos, solúveis em água e compostos principalmente por unidades de α -L-ramnose, β -D-xilose, ácido β -D-glucurônico e α -L-ácido idurônico, ligadas através de ligações glicosídicas (1 \rightarrow 4). Adicionalmente, as proporções entre estes monossacarídeos podem variar (LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; LAHAYE; ROBIC, 2007; ROBIC et al., 2009; SHAO et al., 2017).

LAHAYE (1998), determinou diferentes sequências para os monossacarídeos constituintes das ulvanas, propondo que estes se apresentam na forma de quatro díades principais distintas, propondo ainda um código com letras e números para cada, como demonstrado na FIGURA 12. As díades contendo ácidos urônicos, foram denominadas de Ulvanobiurônico 3-sulfato, tipo A (A_{3s}) e tipo B (B_{3s}), sendo referentes as [\rightarrow 4)- β -D-GlcAp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap 3-sulfato-(1 \rightarrow)] e [\rightarrow 4)- α -L-IdoAp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap 3-sulfato-(1 \rightarrow)], respectivamente. Adicionalmente foram descritas as díades Ulvanobiose 3-sulfato (U_{3s}) e Ulvanobiose 2'3'-disulfato ($U_{2',3s}$), sendo referentes a [\rightarrow 4)- β -D-xylp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap 3-sulfato-(1 \rightarrow)] e [\rightarrow 4)- β -D-xylp 2-sulfato-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap 3-sulfato -(1 \rightarrow)], respectivamente.

FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS DÍADES DE ULVANA PROPOSTAS POR LAHAYE (1998)



FONTE: O autor (2018).

2.4.1 Aplicações e produção das ulvanas

Diferentemente das galactanas e do alginato, as ulvanas não são hidrocolóides, que por consequência quase não são utilizadas na indústria (LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997).

Atualmente algumas espécies de macroalgas verdes são utilizadas como alimentos, pois são interessantes fontes de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longo, vitaminas e minerais, além de apresentam altos índices de fibras dietéticas. (SHAHIDI, 2009; ORTIZ et al., 2006). Além disto algumas espécies são utilizadas pela agroindústria como fertilizantes (GARG et al., 1992) e vem crescendo os estudos de utilização destas macroalgas para produção de bioetanol (EL HARCHI; FAKIHI KACHKACH; EL MTILI, 2018).

As ulvanas são materias que atendem a diversos requisitos para aplicações biomédicas (engenharia de tecido, medicina regenerativa e administração de medicamentos), como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, apresentando-se como polissacarídeos versáteis, abundantes e de fontes renováveis. Entretanto apesar das propriedades promissoras relacionadas a este material, o uso de ulvanas nas áreas

biomédicas não é relatado, devido principalmente a sua alta solubilidade em soluções aquosas. O uso destes polissacarídeos para estes fins necessitaria de modificações químicas adequadas em sua estrutura química (CHIELLINI; MORELLI, 2011).

Adicionalmente, as macroalgas *Ulva sp* tem sido cultivadas para o tratamento de efluentes, atuando como biofiltros, devido a capacidade de absorver e metabolizar rapidamente elevadas cargas de nitrogênio e apresentarem alta resistência às condições de estresse ambientais (DEL RÍO; RAMAZANOV; GARCÍA-REINA, 1996). Além disso, apresentam-se como potenciais algas para cultivos integrados à carcinicultura marinha (ALENCAR; JUNIOR; CELINO, 2011).

2.4.2 Propriedades biológicas das ulvanas

As ulvanas nativas não apresentam muitas atividades biológicas, quando comparadas as carragenanas, apesar de algumas atividades já terem sido reportadas.

TABARSA e colaboradores (2018), utilizaram os polissacarídeos extraídos da macroalga *Ulva intestinalis*, para realizaram testes de imunomodulação em células RAW264.7. Os referidos autores extraíram e fracionaram através de colunas de DEAE sepharose, com NaCl os polissacarídeos, obtendo duas frações (F1 e F2). Através da caracterização química foi determinado que a fração F1 era composta por baixos teores de sulfato e menor massa molecular (6,2% e $28,7 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$), quando comparada a fração F2 (24,5% e $87,2 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$). Tanto a fração F1 como F2, induziram a proliferação celular macrofágica RAW264.7, entretanto apenas a fração F1 estimulou as células a liberarem óxido nítrico. Os autores propõem que a maior atividade da fração F1 é devido ao sua menor massa molecular, quando comparada as frações nativa e F2.

THANH e colaboradores (2016), investigaram a citotoxicidade da ulvana, extraída da *U. lactuca*, contra três linhagens celulares humano: HepG2 (carcinoma hepatocelular), MCF7 (carcinoma da mama) e Hela (carcinoma de colo do útero). A ulvana apresentou atividades citotóxicas significativas contra as três linhagens celulares: HepG2 ($\text{IC}_{50} 29,67 \pm 2,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MCF7 ($\text{IC}_{50} 25,09 \pm 1,36 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e Hela ($\text{IC}_{50} 36,33 \pm 3,84 \mu\text{g.mL}^{-1}$), de forma dose dependente, apresentando-se como um composto promissor no combate ao câncer.

GOVINDAN; THOMAS, KURUP, (2012) realizaram o fracionamento (em coluna cromatográfica sephacryl S-400) da ulvana extraída da *Ulva fasciata*, obtendo a fração UF1, a qual foi testada *in vitro* a fim de se investigar a atividade antioxidante e

de citotoxicidade contra o modelo tumoral DLA (*Daltons Lymphoma Ascites*). A fração UF1 apresentou tanto atividade antioxidante como antitumoral, de forma dependente da concentração.

2.5 MODIFICAÇÕES QUÍMICA EM POLISSACARÍDEOS

Alguns polissacarídeos não apresentam ou apresentam fracas atividades biológicas. Deste modo, a modificação da estrutura química dos polissacarídeos vem atraindo muito a atenção, pois elas podem fornecer uma oportunidade para potencializar suas atividades biológicas ou proporcionar a produção de novos biomateriais (LIU et al., 2017a). Dentre as modificações químicas aplicadas em polissacarídeos, estão incluídas a sulfatação, amidação, aminação reductiva, tosilação e aminação.

Na literatura existem relatos que reações de sulfatação em polissacarídeos introduziram ou melhoraram algumas atividades biológicas, tais como: (1) anticoagulante, observada para carragenanas (DE ARAÚJO et al., 2013), polimanuronato e poliguluronato de baixa massa molecular (LI et al., 2017), pululanas (ALBAN; SCHAUERTE; FRANZ, 2002), celulose (GERICKE et al., 2011) e pectinas cítricas (BAE et al., 2009); (2) antifúngica observada para ulvanas (DE FREITAS et al., 2015a); (3) antitumoral observada para galactanas extraídas do fruto borojo (*Borojoa sorbilis*) (XU et al., 2016) e (4) antimicrobianas observada para pectinas cítricas (BAE et al., 2009).

Reações de amidação através da derivatização do grupo carboxila presente no alginato de sódio com diferentes aminas, têm despertado o interesse para produção de novos biomateriais. Alguns derivados do alginato de sódio apresentam potenciais aplicações na área biomédica: alginato-biotina (POLYAK, GERESH, MARKS, 2004) e alginato-1-naftilamida (CHEJARA et al., 2013). Enquanto outros derivados apresentam aplicações na área de engenharia de tecido e regeneração, promovendo proliferação celular e diferenciação: alginato-etilenodiamina (PARK et al., 2017) e alginato-RGD (RGD: sequência peptídica Arginina-Glicina-Ácido Aspártico) (ROWLEY; MOONEY, 2002).

Adicionalmente, alguns derivados alginato-amida, podem proporcionar uma melhora nas atividades biológicas do alginato de sódio. MAROUNEK E COLABORADORES (2017) produziram e avaliaram atividades hipocolesterolêmica e hipolipidêmica *in vivo* (ratos), tanto do derivado amidado (alginato-octadecilamida),

como do alginato de sódio sem modificação. Estes autores observaram que o derivado amidado é um agente hipocolesterolêmico mais eficaz do que seu polissacarídeo nativo (alginato).

Já as reações de aminação redutiva, são importantes métodos utilizados na síntese orgânica, devido à versatilidade dos intermediários produzidos, amplamente utilizada para aplicações laboratoriais e industriais, desde a imobilização de proteínas até a síntese de nanopartículas (VERMA, GU, 2012). Este método permite a conversão de carbonilas oriundas de aldeídos ou cetonas, em aminas.

Em polissacarídeos, as reações de aminação redutiva vêm sendo utilizadas na produção de copolímeros, através de semissíntese. O copolímero anfifílico dextrana- β -PLA (PLA: poliácido láctico), pode ser utilizado no processo de encapsulamento de drogas hidrofílicas, na forma de nanopartículas, devido a biocompatibilidade e solubilidade em água (VERMA, GU, 2012). Além disto, polissacarídeos híbridos também foram produzidos a partir da aminação redutiva entre a ulvana e a carrabiose 4²-sulfato (COLODI, 2017).

As reações de tosilação visam a conversão das hidroxilas em bons grupos de saída, produzindo polissacarídeos intermediários versáteis, para a preparação de outros derivados. O grupo tosil pode ser substituído através de reações de por azida, aminas (GERICKE et al., 2012) ou qualquer outro bom nucleófilo.

Em polissacarídeos as reações de tosilação vêm sendo aplicadas para a produção de diferentes intermediários. A tosilação da quitosana foi utilizada para produção da 6-deoxi-azido quitosana (ZAMPANO; BERTOLDO; CIARDELLI, 2010); enquanto a partir da agarose tosilada foram produzidos a 6-deoxi-azido agarose e a 6-deoxi-6-(etilamino)amina agarose, as quais apresentam grandes potenciais para produção de materiais funcionalizados (GERICKE; HEINZE, 2015); e a partir da celulose tosilada foram produzidos a 6-deoxi-6-(etilamino)amina celulose, 6-deoxi-6-azido celulose e a 6-deoxi-6-tiosulfato celulose (SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014).

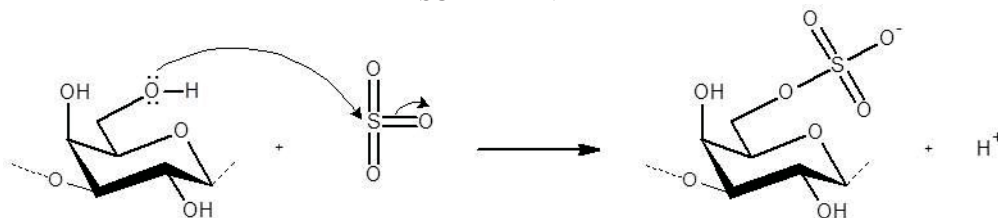
Adicionalmente as metodologias de modificação química: sulfatação, amidação e aminação redutiva, tosilação e aminação, podem ser realizadas utilizando diferentes reagentes e condições reacionais, como será descrito a seguir.

2.5.1 Sulfatação química de polissacarídeos

Nos últimos anos, a crescente importância biológica dos polissacarídeos sulfatados, ampliou o desenvolvimento de novas metodologias para a modificação do padrão de sulfatação em polissacarídeos sulfatados naturalmente, bem como à produção de polissacarídeos quimicamente sulfatados a partir de polissacarídeos nativos não sulfatados (BEDINI et al., 2017).

Reações de sulfatação, introduzem grupos sulfato (SO_4^-) na cadeia polimérica através do ataque nucleofílico da hidroxila ao enxofre formando grupos ésteres de sulfato (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010). A FIGURA 13 mostra o ataque nucleofílico do oxigênio do C6 da unidade de β -D-galactopiranosose ao trióxido de enxofre e formação do grupo éster de sulfato.

FIGURA 13 – FORMAÇÃO DOS GRUPOS ESTERES DE SULFATO EM REAÇÕES DE SULFATAÇÃO QUÍMICA ENVOLVENDO TRIÓXIDO DE ENXOFRE COMO AGENTE SULFATANTE



FONTE: O autor (2018).

Na literatura estão reportadas inúmeras metodologias de sulfatação química, no entanto, não existe um método universal para síntese de polissacarídeos sulfatados, sendo de grande importância a escolha apropriada da metodologia, para cada polissacarídeo (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010; WANG et al., 2018). Além disto, as reações de sulfatação geralmente são realizadas sob condições não regioseletivas, proporcionando polissacarídeos com diferentes padrões de sulfatação. Adicionalmente, em determinadas condições reacionais, podem ser obtidos polissacarídeos persulfatados (BEDINI et al., 2017).

Diversos fatores e características dos polissacarídeos influenciam no sucesso da reação. A eficiência da reação esta diretamente relacionada a identidade dos monossacarídeos presentes, a anomericidade das ligações glicosídicas, massa molecular do polímero, tempo e temperatura de reação, agente de sulfatação e o meio reacional (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

Alguns reagentes de sulfatação como o ácido clorosulfônico, ácido sulfâmico e trióxido de enxofre causam despolimerização, devido a quebra das ligações glicosídicas,

mesmo quando utilizados sob condições controladas de reação, baixas temperaturas e tempos de reação (BEDINI et al., 2017).

A fim de se evitar degradação do polissacarídeo durante as reações, vem sendo amplamente utilizados complexos de trióxido de enxofre e bases de Lewis, como por exemplo o complexo trióxido de enxofre-piridina, trióxido de enxofre-trietilamina, trióxido de enxofre-trimetilamina. Desta forma as reações são realizadas com maior estabilidade, devido ao caráter mais brando destes reagentes (AL-HORANI; DESAI, 2011; BEDINI et al., 2017; CHOPIN et al., 2018; NAGASAWA et al., 1972).

Os polissacarídeos sulfatados podem ainda ser obtidos através de reações homogêneas ou heterogêneas, entretanto os meios homogêneos são mais eficientes, pois melhoram a acessibilidade da hidroxila ao agente sulfatante, aumentando a eficiência de reação (CHOPIN et al., 2015).

Diversos solventes são usualmente utilizadas nestas reações, tais como: *N,N*-dimetilacetamida (DMAc), formamida, cloreto de lítio (LiCl), dimetilsulfóxido (DMSO) e *N,N*-dimetilformamida (DMF). No entanto, devido a baixa solubilidade dos polissacarídeos hidrofílicos em solventes orgânicos, bem como os processos de despolimerização causados durante as reações, a utilização dos líquidos iônicos (ILs), como solventes em reações de sulfatação, tem despertado interesse (CHOPIN et al., 2015).

O líquido iônico é um composto geralmente formado por um cátion orgânico e um ânion inorgânico ou orgânico, que têm demonstrado inúmeras vantagens aos solventes comuns, como por exemplo o baixo ponto de fusão (abaixo de 100 °C) e a alta dissociação iônica. Desta forma, estes compostos facilitam tanto a dissolução de reagentes orgânicos como inorgânicos, sendo consideradas excelentes interfaces para promover a química dos carboidratos (CHOPIN et al., 2015; PINKERT et al., 2009; ZAKRZEWSKA; BOGEL-YUKASIK; BOGEL-YUKASIK, 2010).

Adicionalmente, meios reacionais de líquido iônico em sulfatações químicas, geralmente, fazem-se necessário a adição de um solvente orgânico (DMF), a fim de diminuir a viscosidade do meio, garantindo uma distribuição homogênea de grupos sulfatos pela molécula (GERICKE et al., 2011). Além disto, este tipo de reação pode apresentar desvantagens, devido à ocorrência de degradações significativas nos polissacarídeos e o custo elevado destes materiais (CHOPIN et al., 2015; PINKERT et al., 2009; ZAKRZEWSKA; BOGEL-YUKASIK; BOGEL-YUKASIK, 2010).

Na tentativa de diminuir os processos de degradação, algumas reações de sulfatação fazem uso de reagentes que tendem a diminuir a despolimerização indesejada dos polissacarídeos, como por exemplo o 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e o 2-metil-2-buten-1-ol (2M2B) (CHOPIN et al., 2015; PAPY-GARCIA et al., 2005).

A solubilidade de polissacarídeos em solventes orgânicos pode ser melhorada com a troca do contra íon, associado ao grupo carregado negativamente, por trietilamônio. DE ARAUJO e colaboradores relatam a melhora considerável da solubilidade da *kappa*-carragenana em DMF após os grupamentos sulfatados terem o contra íon sódio trocado por trietilamônio.

A TABELA 3 apresenta diferentes condições reacionais empregadas na sulfatação química de polissacarídeos reportados na literatura.

CHOPIN e colaboradores (2015) relatam a sulfatação química do exopolissacarídeo GY785, um nonassacarídeo monossulfatado composto por unidades de: ácido glucurônico, ácidos galacturônico, glucose e galactose, na proporção de (2:1:4:2). Foram utilizadas duas metodologias de sulfatação: a primeira com solvente orgânico (DMF) e complexo de trióxido de enxofre-piridina (SO_3Py), e uma segunda metodologia utilizando solvente iônico (BMIMCl), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e o complexo de trióxido de enxofre-piridina (SO_3Py). O processo de sulfatação que utilizou o BMIMCl como solvente, apresentou uma etapa a menos de reação, pois não necessitou converter o polissacarídeo na forma de sal de piridínio, como na sulfatação com DMF. Adicionalmente, o catalisador, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), foi adicionado à primeira reação, para aumentar a taxa de reação e diminuir a despolimerização indesejada, além de uma pequena quantidade de DMF ser adicionada juntamente com o complexo $\text{SO}_3\text{-Py}$, a fim de reduzir a viscosidade do meio de reação. Desta forma os autores constataram que ambas reações produziram polissacarídeos sulfatados, e que a sulfatação realizada no BMIMCl permitiu uma modificação mais eficiente, desprovido de reações colaterais (despolimerização ou degradação), como ocorreu na segunda metodologia.

Já BO e colaboradores (2013), realizaram a sulfatação da glucomanana extraída do tubérculo de *Amorphophallus konjac*, com dois agentes sulfatantes distintos: complexo trióxido de enxofre-piridina ($\text{SO}_3\text{-Py}$) e ácido piperidino-N-sulfônico (P4S). Os autores observaram que a sulfatação da glucomanana com o $\text{SO}_3\text{-Py}$, promoveu uma menor despolimerização e degradação, além de apresentar um maior valor de DS

(substituição por grupos sulfato), quando comparada com a reação de sulfatação utilizando o agente P4S.

A presença de grupos sulfatados nos polissacarídeos altera as propriedades físicas (em solução), como também aumenta as cargas negativas na superfície dos polissacarídeos, o que pode promover ou potencializar determinadas atividades, como por exemplo antioxidante e antitumoral (LIANG et al., 2014; WANG et al., 2018).

Em geral, a posição de substituição apresenta uma maior influência na atividade biológica, do que o grau de substituição do polissacarídeos. Estudos de sulfatação em carragenanas e a avaliação da citotoxicidade, em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), dos materiais nativos e modificado, demonstraram que além da massa molecular influenciar na proliferação celular (carragenanas de massa molecular inibem de forma dose-dependente), as posições sulfatadas também apresentam influência. A sulfatação no C2 das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose elimina a citotoxicidade e beneficia a proliferação celular. Enquanto que o efeito sinérgico da sulfatação em C4 e C2 das unidades de β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose, respectivamente, diminui ou elimina a citotoxicidade das carragenanas. Adicionalmente, a introdução de grupos sulfato no C6 das unidades de β -D-galactopiranosose, afetará significativamente a proliferação celular. Desta forma, foi estabelecida a ordem de citotoxicidade dos grupos sulfato nas unidades de β -D-galactopiranosose: C6 > C4 > C2 e que são mais citotóxicas que C2 das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (LIANG et al., 2014).

TABELA 3 – DIFERENTES CONDIÇÕES REACIONAIS PARA SULFATAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS

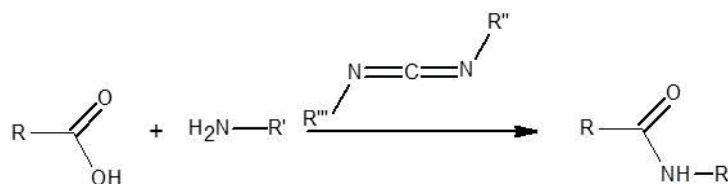
Polissacarídeo	Agente sulfatante	Meio reacional	Temp. (°C)	Tempo (h)	Referência
Quitosana	ClSO ₃ H	DMF	80-90	4	RONGHUA; YUMIN; JIANHONG, 2003
Agarose	SO ₃ -Py	Formamida/Piridina	90	4	MATSUHIRO et al., 2014
Ulvana	SO ₃ -Py	Formamida	60	4	DE FREITAS et al., 2015
Alginato	P4S	Formamida/Piridina	40	4	CONG et al., 2014
<i>kappa</i> -carragenana	SO ₃ -Py	DMF/2M2B	20	7	DE ARAÚJO et al., 2013
Dextrana	P4S	DMSO	80	1	NAGASAWA et al., 1972
Glicoglucuronomanana	ClSO ₃ H	Formamida/Piridina	4	12	BARDDAL et al., 2015
Pectina cítrica	ClSO ₃ H	Formamida	80-90	4	BAE et al., 2009
Glucomanana	SO ₃ -Py	DMSO	60	0,75	BO et al., 2013
Glucomanana	PS4	DMSO	85	2	BO et al., 2013
Celulose	SO ₃ -Py	DMAc/LiCl	27	6	QIN et al., 2014
Celulose	SO ₃ -Py	BMIImCl/DMF	25	2	GERICKE et al., 2011
GPP	ClSO ₃ H/Py	BMIImCl/DMAP	30	1	CHEN et al., 2011
GY785 EPS	SO ₃ -Py	BMIImCl/DMF/DMAP	70	2	CHOPIN et al., 2015
GY785 EPS	SO ₃ -Py	DMF	45	2	CHOPIN et al., 2015

FONTE: O autor (2018).

2.5.2 Amidação de polissacarídeos

Reações utilizando carbodiimidas promovem o acoplamento de grupos carboxílicos com moléculas contendo aminas primárias ou secundárias, produzindo amidas (FIGURA 14). Estas reações são particularmente interessantes e têm sido amplamente estudadas nas últimas décadas. (CHHATBAR et al., 2012; KRAUS; LIU, 1995; KUNIOKA; FURUSAWA, 1997; ROWLEY; MOONEY, 2002; TAUBNER; MAROUNEK; SYNITSYA, 2017).

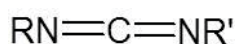
FIGURA 14 – REAÇÃO GERAL DE CONVERSÃO DE CARBOXILAS EM AMIDA EMPREGANDO CARBODIIMIDA



FONTE: O autor (2018).

As carbodiimidas são compostos insaturados, com ligações geminadas (KHORANA, 1953), conforme representado na FIGURA 15.

FIGURA 15 – ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DE CARBODIIMIDAS



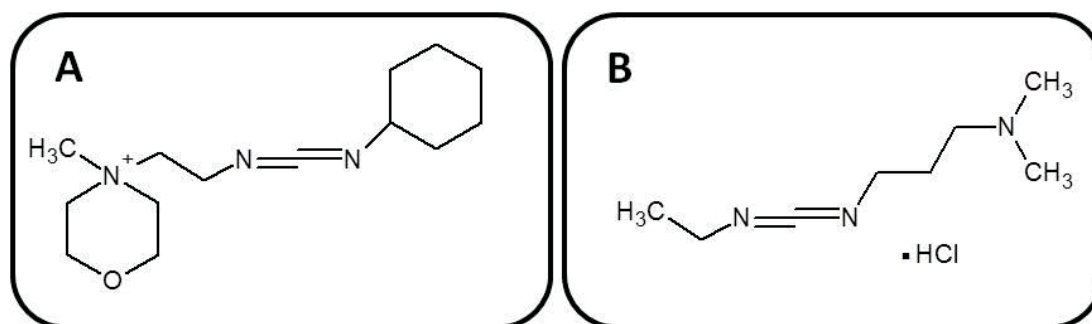
FONTE: O autor (2018).

A estabilidade da carbodiimida está diretamente relacionada com os grupos substituintes (R). Estudos com diversas carbodiimidas alifáticas demonstraram que o aumento da cadeia alquila tem um efeito benéfico na estabilidade das mesmas. Outro fator que influencia na estabilidade, é a ramificação dos substituintes alquilas aos dois átomos de nitrogênio, seguindo a ordem crescente: $\text{RCH}_2 < \text{R}_2\text{CH} < \text{R}_3\text{C}$ (KHORANA, 1953).

As reações de amidação utilizando carbodiimidas podem ser realizadas tanto em meios aquosos como orgânicos. As carbodiimidas solúveis em meio aquoso como a *N*-ciclohexil-*N'*-(2-morfolinoetil) carbodiimida (CMC) e hidrocloreto de *N*-(3-

Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) (FIGURA 16) apresentam diferentes níveis de estabilidade devido aos diferentes substituintes, visto que a CMC apresenta substituintes ciclohexil e 2-morfoninoetil, enquanto a EDC apresenta etil e 3-dimetilaminopropil, como radicais substituintes aos nitrogênios R e R', respectivamente.

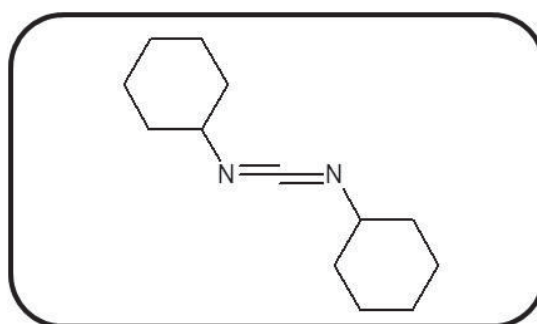
FIGURA 16 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DAS CARBODIIMIDAS EDC E CMC



FONTE: O autor (2018). **A** e **B** representam as estruturas das carbodiimidas CMC e EDC, respectivamente.

Já a *N,N'*-Diciclohexilcarbodiimida (DCC), é utilizada para reações de conjugações com carboxilas, em meio orgânico. A DCC apresenta dois grupos ciclohexil como substituintes (FIGURA 17), proporcionando uma maior estabilidade frente as outras duas carbodiimidas (EDC e CMC).

FIGURA 17 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA CARBODIIMIDAS DCC



FONTE: O autor (2018).

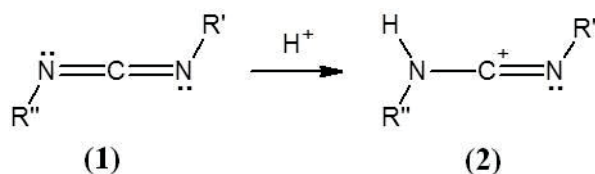
A grande maioria das reações reportadas para amidações de ácidos carboxílicos dos polissacarídeos ocorrem mediante a utilização da EDC (ABU-RABEAH et al., 2005; CHHATBAR et al., 2012; ROWLEY; MOONEY, 2002; SHAO et al., 2014; PEI

et al., 2018). Segundo SCHANTÉ e colaboradores (2011), a EDC é frequentemente utilizada principalmente devido a sua solubilidade em meio aquoso. Enquanto uma pequena parcela de reações faz uso da DCC (JEON; PARK; YOO, 2002; KRAUS; LIU, 1995), e uma minoria faz uso da CMC em processos de *crosslink* (AHN et al., 2013).

O uso de carbodiimida em reações de amidação apresentam algumas vantagens, como a utilização de reagentes não tóxicos ou perigosos, além de possibilitar que as reações ocorram em soluções aquosas. Adicionalmente, estas reações podem ser realizadas à temperatura ambiente, o que proporciona a preservação da distribuição molecular dos polissacarídeos. Entretanto, a utilização da carbodiimida EDC pode gerar subprodutos indesejáveis, como descrito a seguir.

NAKAJIMA E IKADA (1995) foram os responsáveis por desvendar, após estudos detalhados, o mecanismo da reação de amidação de ácidos carboxílicos via carbodiimida EDC. O mecanismo de reação de amidação de ácido carboxílicos via carbodiimida (FIGURA 18) inicia-se com a protonação da carbodiimida (1), produzindo um carbocátion (2) (NAKAJIMA; IKADA, 1995)

FIGURA 18 – ATIVAÇÃO DA CARBODIIMIDA



FONTE: O autor (2018).

Adicionalmente, a FIGURA 19, demonstra o mecanismo de amidação quando a carbodiimida está em presença de grupos carboxilatos (COO^-) (3). Devido este grupo ser considerado uma base forte, é capaz de realizar o ataque nucleofílico ao carbocátion (2), produzindo o intermediário *O*-acilisouréia (4), um éster carboxílico altamente reativo, devido a presença de um bom grupo de saída. Este intermediário reage através de um novo ataque nucleofílico por uma amina primária ou secundária (5). Através de um rearranjo intramolecular ocorre a transferência de um próton (6) oriundo da amina para o nitrogênio da carbodiimida (7). E por fim após a saída do grupo abandonador (8), ocorre formação da amida (9) e do derivado uréia (10). Os produtos formados durante a reação dependem da natureza da carbodiimida, do ácido carboxílico, do solvente

reacional e temperatura (HOARE; KOSHLAND, 1967; KHORANA, 1953, NAKAJIMA, IKADA; 1995; MAJORRADI, 2011).

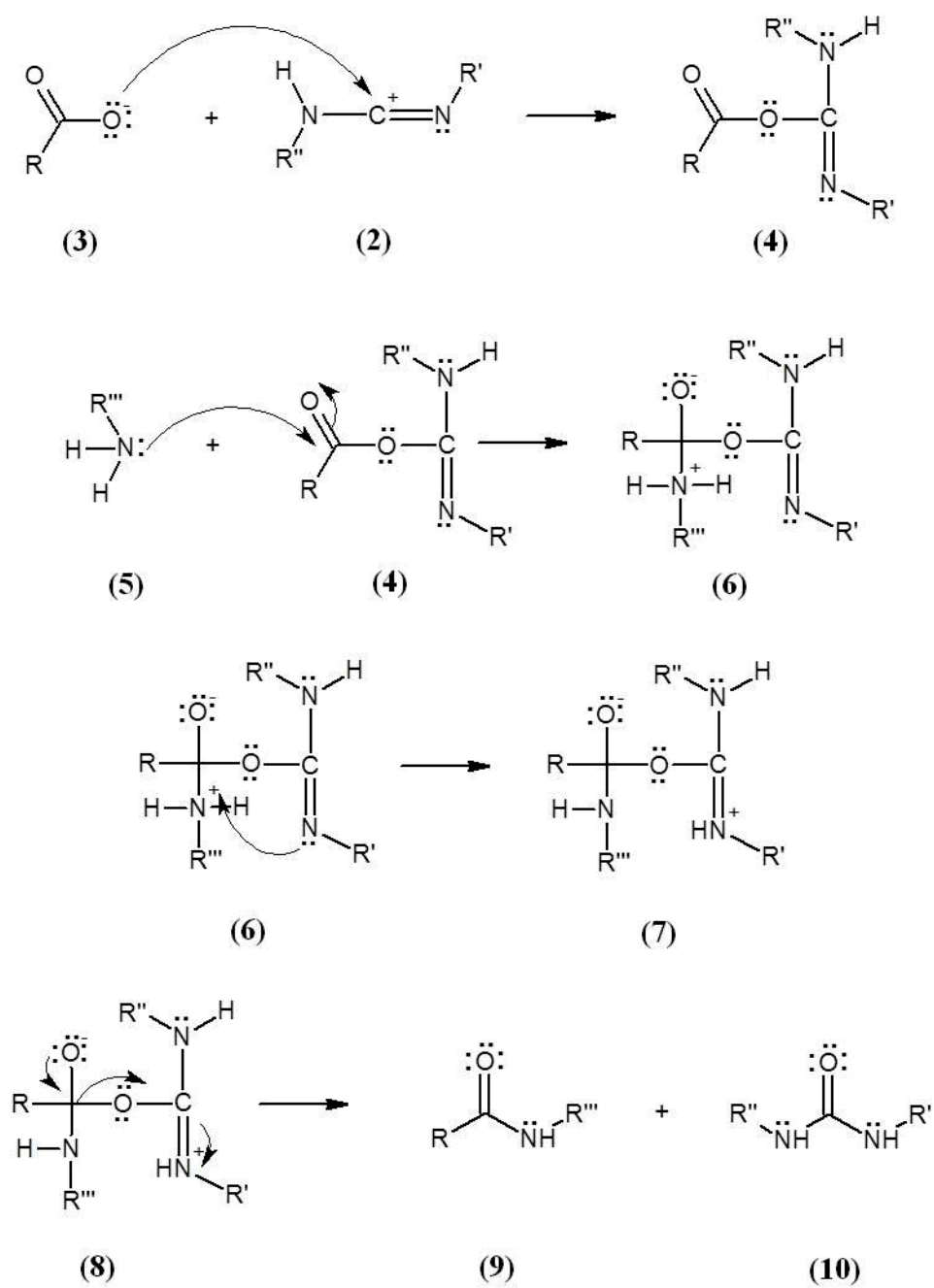
Entretanto, o intermediário *O*-acilisouréia (**4**), é um composto instável em soluções aquosa, podendo ser rearranjado rapidamente a *N*-aciluréia (isômeros **11** e **12**), subproduto estável, não reativo com as amins, comumente reportado na literatura em reações de amidação, que fazem uso da carbodiimida EDC (FIGURA 20) (BULPITT; AESCHLIMANN, 1999; ESTE; EGLIN; ALINI, 2014; NAKAJIMA; IKADA, 1995).

BULPITT E ASCHLIMANN (1999), demonstraram que a formação do subproduto *N*-aciluréia pode evitada ou minimizada, quando se faz uso de *N*-hidroxisuccinimida (NHS), ou da 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (FIGURA 21). Quando usados em conjunto a carbodiimida EDC, ocorre a formação de um composto mais estável e resistente (tanto para o rearranjo como para hidrólise), impedindo a formação da *N*-aciluréia, tornando possível a reação de acoplamento de amins primárias as carboxilas.

O mecanismo de reação entre a *O*-acilisouréia e NHS (FIGURA 21), inicia-se pelo ataque nucleofílico da NHS (**13**) ao carbono carbonílico da *O*-acilisouréia (**4**), resultando no abandono do derivado ureia (**11**) e a formação do éster succinímico (**16**). Adicionalmente a amina primária (**5**) realiza o ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do intermediário éster (**16**). Através do rearranjo (**17**), o NHS é regenerado (**13**) e formando o derivado amida (**10**) (BULPITT; AESCHLIMANN, 1999; ESTE; EGLIN; ALINI, 2014), como demonstrado na FIGURA 23.

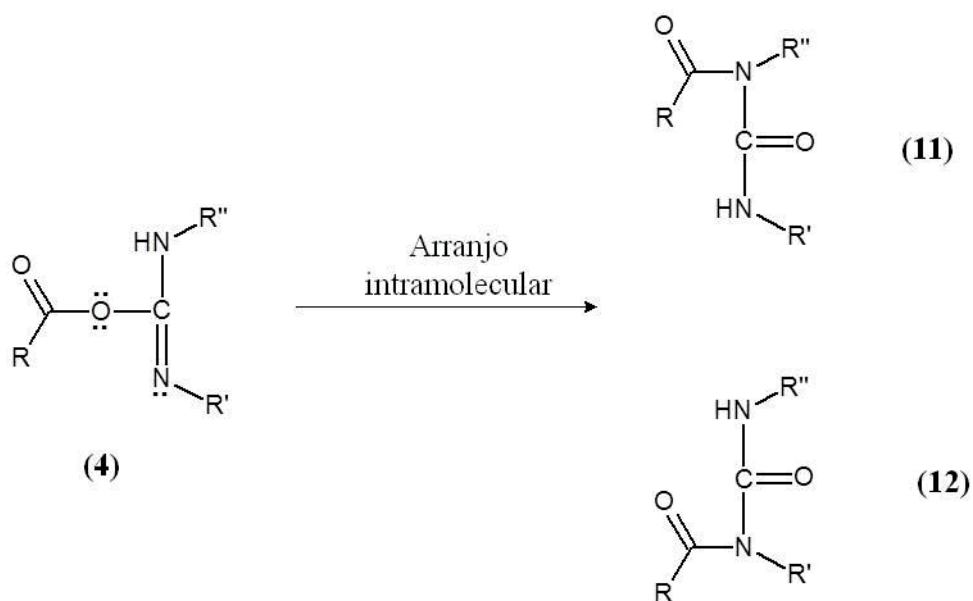
Em reações de amidação via carbodiimida em meio aquoso, a formação de produtos secundários indesejáveis, é fortemente dependente do pH reacional e da concentração de carbodiimida. Uma alta concentração de carbodiimida tem a tendência de aumentar a formação do subproduto *N*-aciluréia (SWAISGOOD; NATAKE, 1973). Porém frequentemente, um excesso de carbodiimida é utilizado em modificações de polissacarídeos, a fim de se garantir a reação (DANISHEFSKY & SISKOVIC, 1970).

FIGURA 19 – MECANISMO DE FORMAÇÃO DA AMIDA A PARTIR DE CARBOXILATO EM PRESENÇA DE CARBODIIMIDA



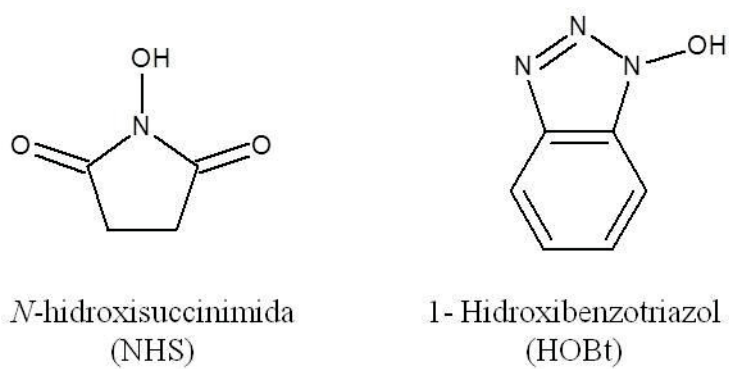
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 20 – FORMAÇÃO DA N-ACILURÉIA



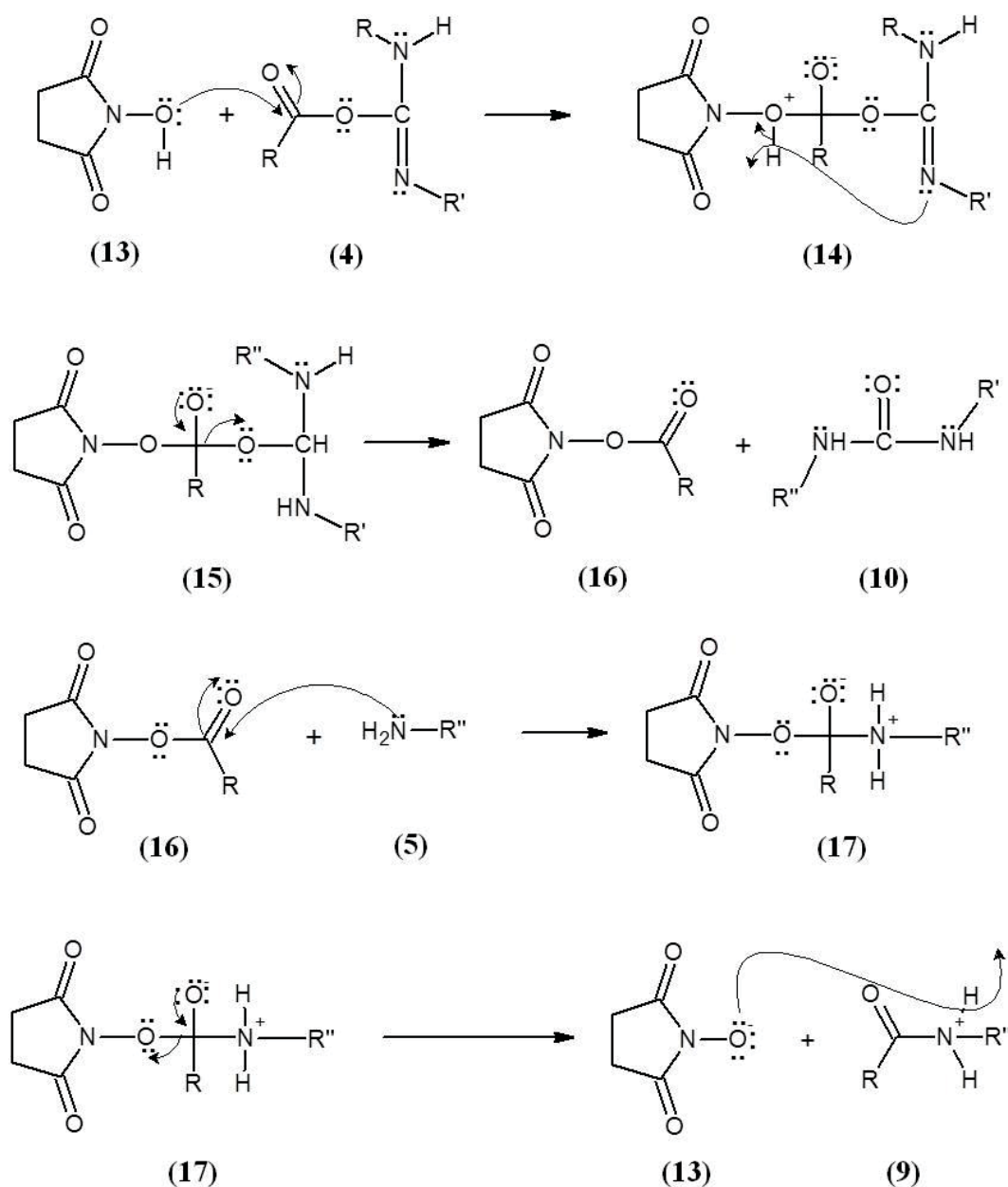
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 21 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DE NHS E HOBt



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 22 – MECANISMO DE FORMAÇÃO DA AMIDA EM PRESENÇA DA NHS E CARBODIIMIDA.



FONTE: O autor (2018).

NAKAJIMA e IKADA (1995), investigaram os efeitos de vários fatores que poderiam influenciar a reação com carbodiimida em um sistema aquoso na formação de amidas. Dentre eles o efeito do pH e a dissociação dos grupos carboxilas e amino. Os autores testaram a estabilidade da carbodiimida EDC em diferentes pHs a 25 ° C, e como resultado concluíram que a EDC é bastante estável na região de pH neutro, por pelos menos 5 h. Porém a sua atividade diminuiu em pH ácido. Os mesmos autores avaliaram também a concentração de EDC com relação ao pH, e observaram que ocorreu uma supressão na reação em pH inferior a 3,5, que foi atribuída à diminuição da

dissociação dos grupos carboxilas a baixos pHs. Desta forma, foi sugerido que os prótons e os grupos carboxilas ionizados são necessários para que a reação com EDC ocorra e que esta reação ocorre apenas quando se utiliza um excesso de EDC. Entretanto, a razão molar de EDC e grupos carboxilas não podem ser inferior a 0,5.

Ressalta-se que as reações de ativação da carbodiimida EDC, requerem pH do meio entre 3,5 – 4,5, para que seja eficiente a ativação (NAKAJIMA; IKADA, 1995). Entretanto, a maior parte das amins neste pH encontram-se protonadas, diminuindo consideravelmente a nucleofilicidade. Portanto a conjugação da carbodiimida EDC/NHS em alguns polissacarídeos exigem a necessidade de um controle preciso do pH reacional. A geração do éster de NHS requer um pH reacional ácido, enquanto o ataque nucleofílico de determinadas amins é apenas eficiente a pH neutro ou alcalino, onde o éster de NHS e alguns compostos são hidroliticamente lábeis (ESTE; EGLIN; ALINI, 2014).

Adicionalmente, há necessidade de que as reações ocorram em tampões desprovidos de grupos carboxilas e amins, impedindo reações laterais, tornando o ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES) um dos tampões mais adequado para este tipo de reação.

Na TABELA 4, são apresentadas algumas das funcionalizações do alginato de sódio, com diferentes grupos através de reações de amidação, além da aplicação proposta para estes derivados amida.

ROWLEY, MOONEY, 2001, realizaram a amidação de diferentes tipos de alginato (ricos em unidades de ácido β -D-manurônico ou ricos em unidades de ácido α -L-gulurônico) com sequências peptídicas RGD, e realizaram testes de proliferação celular. As taxas de proliferação dos mioblastos foram altamente dependentes da relação M:G do alginato modificado, bem como da densidade de ligantes (RGD) no material. Entretanto alginatos com alto percentual de unidades G, mesmo quando aumentada a densidade de ligantes, não aumentaram a capacidade de proliferação celular. Estas respostas diferentes foram correlacionados com a estereoquímica que os dois monômeros apresentam (M e G), demonstrando que os alginatos de diferentes proporções M:G levam a diferentes respostas biológicas.

TABELA 4 – MODIFICAÇÕES QUÍMICA E APLICAÇÕES DOS DERIVADOS DO ALGINATO DE SÓDIO

Ligante	Condições reacionais	Percentual de	Aplicação	Referência
---------	----------------------	---------------	-----------	------------

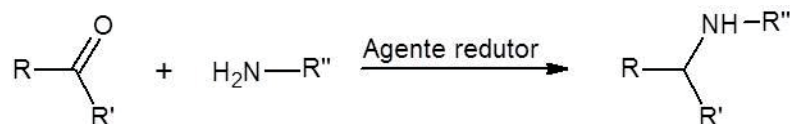
modificação (%)				
Biotina	MES (0,1 mol.L ⁻¹), pH 6,0, NHS, EDC, 3 h, Temp. ambiente.	10 - 13	Encapsulamento de células bioluminescentes	POLYAK; GERESH; MARKS; 2004.
Ác. <i>o</i> -aminobenzoico e Ác. <i>m</i> -aminobenzoico	MES (0,1 mol.L ⁻¹), pH 6,0, NHS, EDC, 12 h, Temp. ambiente.	-	Formulações farmacêuticas e sistemas de liberação	CHHATBAR et al., 2012.
Sequência peptídica RGD	MES (0,1 mol.L ⁻¹), pH 6,5, NHS, EDC, 20 h	55 - 60	Proliferação e diferenciação de celular de mioblastos	ROWLEY e MOONEY, 2001.
1-naftilamina	MES (0,1 mol.L ⁻¹), pH 6,0, NHS, EDC, 12 h, temp. ambiente	-	Biosensores	CHEJARA et al., 2013.

FONTE: O autor (2018).

2.5.3 Aaminação redutiva

Aaminação redutiva, é o termo aplicado ao processo de introdução de grupos aminas, em aldeídos ou cetonas na presença de um agente redutor (FIGURA 23). Estas reações permitem a síntese de diferentes tipos de aminas, com diversas aplicações (ABDEL-MAGID et al., 1996; EMERSON, 1948).

FIGURA 23 – REAÇÃO GERAL DE AMINAÇÃO REDUTIVA



FONTE: O autor (2018).

A reação de aaminação redutiva ocorre por meio da formação de uma base de Schiff (imina), proveniente da condensação da carbonila (eletrófilo) com a amina (nucleófilo), formando o grupo funcional -C=N-R (R: alquil ou aril por exemplo) (BORCH; BERNSTEIN; DURST, 1971).

A condensação entre a carbonila e a amina é uma reação de adição nucleofílica, catalisada por um ácido de Lewis (ácido acético, H^+). O mecanismo de formação da base de Schiff inicia-se pela protonação da carbonila (**18**), levando a protonação do oxigênio (**19**). Em seguida a amina (**5**) realiza o ataque nucleofílico ao carbono carbonílico protonado, que passa a adotar a hibridização sp^3 , gerando um intermediário carbinolamina (hidroxilamina) (**20**). Na sequência ocorre a transferência de próton intramolecular do nitrogênio para a hidroxila, oriunda da carbonila (**21**), e a formação da dupla ligação entre o carbono e nitrogênio elimina a molécula de água formando o íon imínio (**22**), como mostrado na FIGURA 24 (ABDEL-MAGID et al., 1996b).

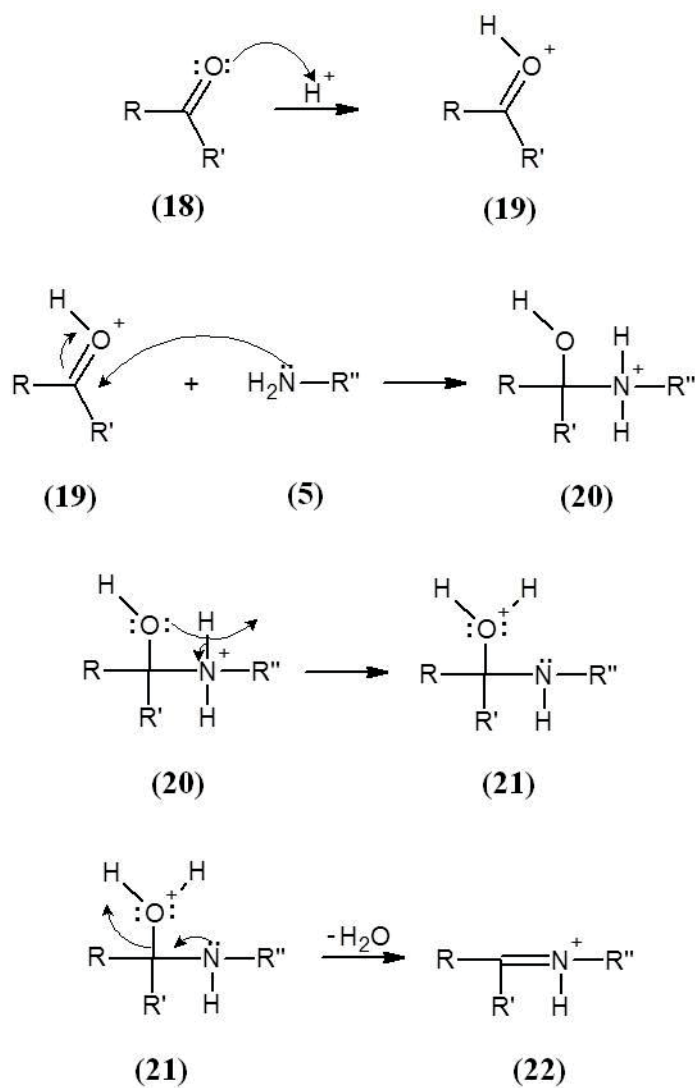
Na etapa seguinte da formação do íon imínio, se faz necessário a escolha cuidadosa do agente redutor. São reportados na literatura diferentes agentes redutores (derivados do boro), capazes de reduzir diferentemente os compostos (aldeído, cetona ou imínio), apresentando determinadas propriedades conforme o meio reacional (pH) (ABDEL-MAGID et al., 1996b). O borohidreto e cianoborohidreto de sódio são exemplos de agentes redutores, entretanto eles apresentam diferentes especificidades nas reduções.

Apesar do borohidreto de sódio (solúvel em água) poder reduzir aldeídos e cetonas, quando é utilizado em reações de aminação redutiva ocasiona baixos rendimentos de ligações C-N. Se a velocidade de formação do íon imínio for baixa, agentes redutores como o borohidreto de sódio irão reduzir as carbonilas do aldeído (material de partida), impedindo que as iminas sejam formadas. Dessa forma, é necessário que o agente redutor seja adicionado à reação somente após a completa adição nucleofílica da amina as carbonila.

BORCH e colaboradores (1971) mostraram que o cianoborohidreto de sódio é um agente redutor estável mesmo em pH ácido (pH 3), capaz de reduzir rapidamente os compostos oriundos da reação da carbonila e amina (íons imínios), apresentando uma maior seletividade à redução da ligação dupla C-N, em pH 6-8, mesmo em presença de aldeídos ou cetonas, diferentemente do borohidreto. Além disto o cianoborohidreto de sódio pode ser utilizado tanto em reações em meio aquoso, como em metanol, proporcionando bons rendimentos (BORCH; BERNSTEIN; DURST, 1971).

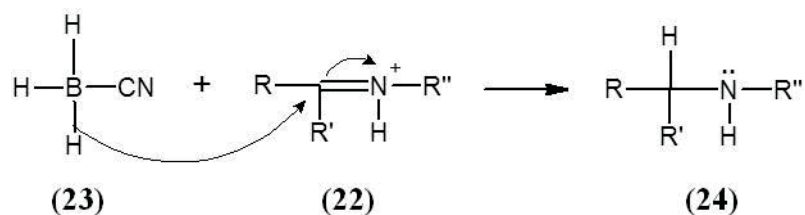
Desta maneira a FIGURA 25 apresenta o mecanismo da reação de redução do íon imínio pelo agente redutor cianoborohidreto de sódio. O íon imínio (**22**) é atacado pelo hidreto oriundo do agente redutor (**23**), dando origem a uma amina secundária (**24**).

FIGURA 24 – MECANISMO DO ATAQUE NUCLEOFÍLICO A CARBONILA DE ALDEÍDO FORMANDO A BASE DE SCHIFF



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 25 – MECANISMO DE REDUÇÃO DO ÍON ÍMINIO PELO AGENTE REDUTOR CIANOBOROHIDRETO DE SÓDIO



FONTE: O autor (2018).

Geralmente as reações são conduzidas utilizando condições suaves, tanto de temperatura como de pH, entretanto as reações de aminação redutiva podem variar de alguns minutos até várias horas (20 min – 24 horas), dependendo o material de partida e da amina utilizada no processo (ABDEL-MAGID et al., 1996b).

2.5.4 Tosilação

Reações de tosilatação em polissacarídeos, visam a transformação da hidroxila em um bom grupo de saída. Os polissacarídeos derivados éster do ácido *p*-toluenossulfônico são moléculas promissoras para a criação de novos materiais poliméricos abrindo novos caminhos para a utilização destes polissacarídeos (ELCHINGER et al., 2012).

Geralmente as reações de tosilatação ocorrem em presença de cloro *p*-toluenossulfônico, em presença de uma base de Lewis (NaOH ou trietilamina). As reações de tosilatação necessitam ser realizadas a baixas temperaturas e em presença de uma base, para prevenir a ocorrência de degradações e reações secundárias, como a formação de derivados cloro-desoxi (ELCHINGER et al., 2012).

As reações podem ser realizadas em meios homogêneos ou heterogêneos. O meio reacional homogêneo (solvente orgânico) permite um controle mais eficiente do grau de substituição (D_{tos}), garantindo uma distribuição uniforme de tosil ao longo da cadeia polimérica (GERICKE; HEINZE, 2015). Entretanto, HEUKO (2015), realizou a tosilatação da agarose em meio heterogêneo (meio aquoso), com sucesso, além disto este tipo de reação utiliza compostos menos tóxicos e mais biodegradáveis.

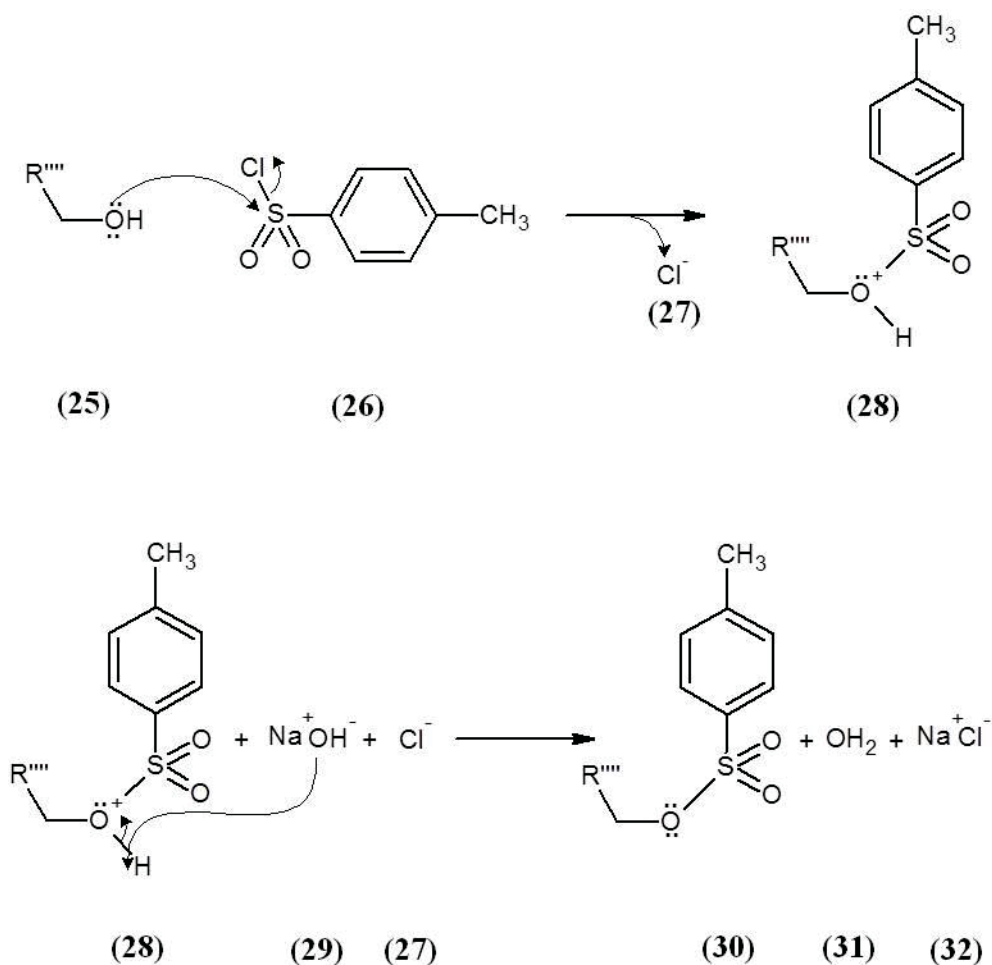
As hidroxilas dos polissacarídeos apresentam diferentes reatividades quanto a tosilatação. Considerando a estrutura química da agarose, como exemplo, as hidroxilas primárias C6 apresentam maior reatividade a reações com grupos tosil, quando

comparadas as hidroxilas secundárias C2 e C4 (HEUSER; HEATH; SHOCKLEY, 1950).

GERICKE , HEINZE (2015), realizaram a tosilação da agarose utilizando o meio homogêneo composto por DMA/LiCl e trietilamina como base. A reação permaneceu por 24 h a 25 °C. Os referidos autores observaram um DS_{Tos} de 1,81, apresentando tosilação principalmente na hidroxila primária C6 das unidades de β -D-galactopiranosose e na hidroxila secundária C2 das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, de forma aproximadamente semelhante. Adicionalmente, HEUKO (2015), realizou a tosilação da agarose utilizando meio heterogêneo aquoso, utilizando acetonitrila para melhorar a solubilidade do ácido *p*-toluenossulfônico, e hidróxido de sódio como base. A reação permaneceu por 24 h a 30 °C. A referida autora observou um DS_{Tos} de 0,96, apresentando tosilação principalmente na hidroxila primária C6 (DS_{Tos} de 0,57) das unidades de β -D-galactopiranosose e na hidroxila secundária C2 (DS_{Tos} de 0,26) das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose. Desta forma a autora concluiu que a tosilação na agarose ocorre preferencialmente nas hidroxilas C6 e C2.

Na FIGURA 26, está mostrado o mecanismo proposto para reação de tosilação em meio aquoso, utilizando o ácido *p*-toluenossulfônico como agente tosilante e hidróxido de sódio (NaOH) como base. Inicialmente ocorre o ataque nucleofílico da hidroxila do polissacarídeo (**25**) ao enxofre do cloreto de *p*-toluenossulfônico (**26**) tendo o cloro como grupo de saída (**27**), formando um éster do ácido *p*-toluenossulfônico protonado (**28**). A hidroxila oriunda da base NaOH (**29**) desprotona o éster do ácido *p*-toluenossulfônico formando o derivado tosil (**30**), uma molécula de água (**31**) e o cloreto abandonado em conjunto ao íon sódio, formando cloreto de sódio (**32**).

FIGURA 26 – MECANISMO PROPOSTO DE TOSILAÇÃO



FONTE: O autor (2018).

Desta forma, os polissacarídeos tosilados apresentam um excelente grupo de saída em reações de deslocamento nucleofílico, como por exemplo a aminação (GERICKE; HEINZE, 2015).

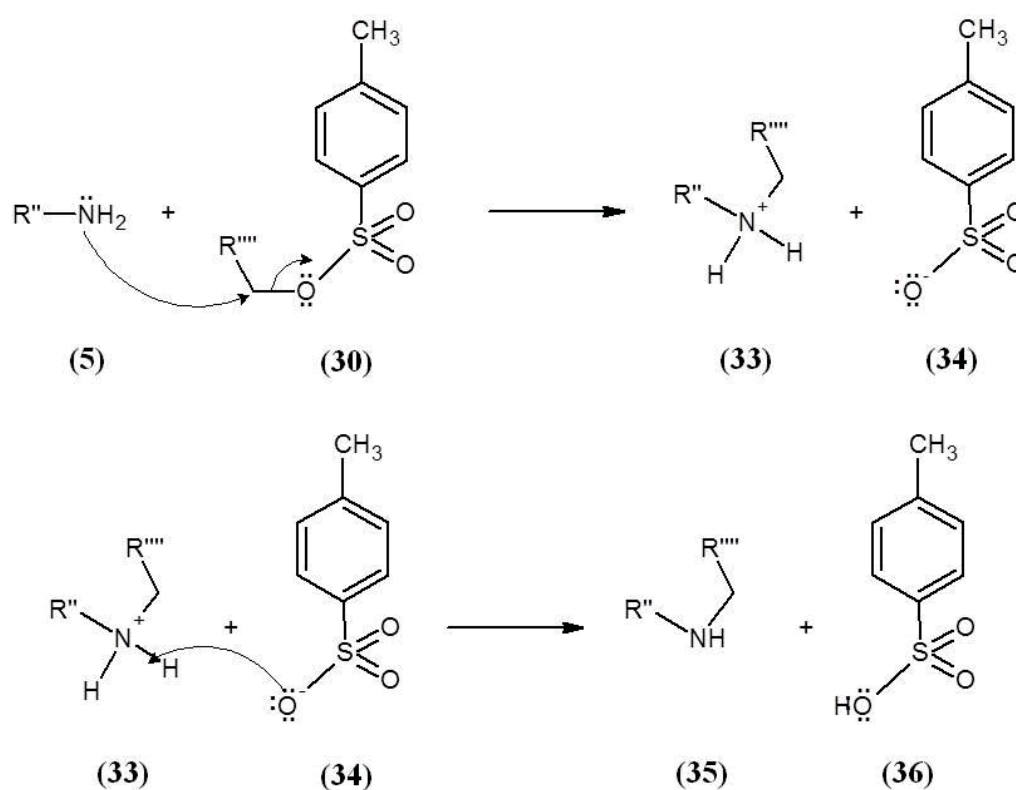
2.5.5 Aminação

As reações de substituição nucleofílica, podem ser de primeira ordem (SN_1) ou segunda ordem (SN_2). A reação de SN_1 apresenta duas etapas, dentre elas a formação de um carbocátion, enquanto a reação SN_2 apresenta o mecanismo em uma única etapa.

Reações de substituição nucleofílica de segunda ordem, ocorrem mediante o ataque do substrato a 180° do grupo de saída (sentido oposto), causando uma inversão de configuração. Tanto a formação como a quebra das ligações ocorrem simultaneamente.

Na FIGURA 28 está apresentado um mecanismo proposto para a substituição nucleofílica de segunda ordem, do grupo tosil por uma amina. A reação inicia-se com a nucleófilo (5) realizando o ataque nucleofílico ao carbono tosilado (30), ao mesmo tempo que ocorre a ligação C-N, ocorre a quebra da ligação entre C-OTos, formando um derivado amina protonado (33) e o grupo tosil (34) desprotonado. Em seguida ocorre a desprotonação do grupo amina pelo tosil gerando o derivado amina (35) e o ácido *p*-toluenossulfônico protonado (36).

FIGURA 27 – MECANISMO PROPOSTO PARA REAÇÃO DE SN2 DO GRUPO TOSIL POR UMA AMINA



FONTE: O autor (2018).

Como estas reações são influenciadas pelo impedimento estérico, a substituição dos grupos tosil em polissacarídeos, ocorre preferencialmente e exclusivamente nas hidroxilas primárias tosiladas (C6), como reportado para a substituição nucleofílica de grupos azida e aminas na celulose (GERICKE et al., 2012; HEINZE et al., 2001; SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014) e por grupos azida na agarose (HEUKO, 2015).

2.6 COPOLIMERIZAÇÃO DE ENXERTIA

A copolimerização de enxertia (*Graft*) é a produção de polímeros que apresentam uma ou mais espécies de blocos conectadas à cadeia principal, constituindo cadeias laterais. Adicionalmente, estas cadeias laterais apresentam características constitucionais e/ou configuracionais distintas da cadeia principal (IUPAC Recommendations 1996).

Para que ocorra as reações de enxertia entre a cadeia polimérica e os blocos laterais, formando redes poliméricas híbridas, são necessários pelo menos dois grupos funcionais reativos, que permitam a formação de ligações entre a cadeia principal e a lateral (BERGER et al., 2004; GONSALVES et al., 2011).

A formação de polímeros de enxertia visa principalmente modificar determinadas propriedades do biopolímero, tais como, estabilidade química e térmica, rigidez estrutural, permeabilidade, eficiência em quelação, capacidade de imobilização proteica e celular ou ainda adicionar propriedades biológicas aos polissacarídeos.

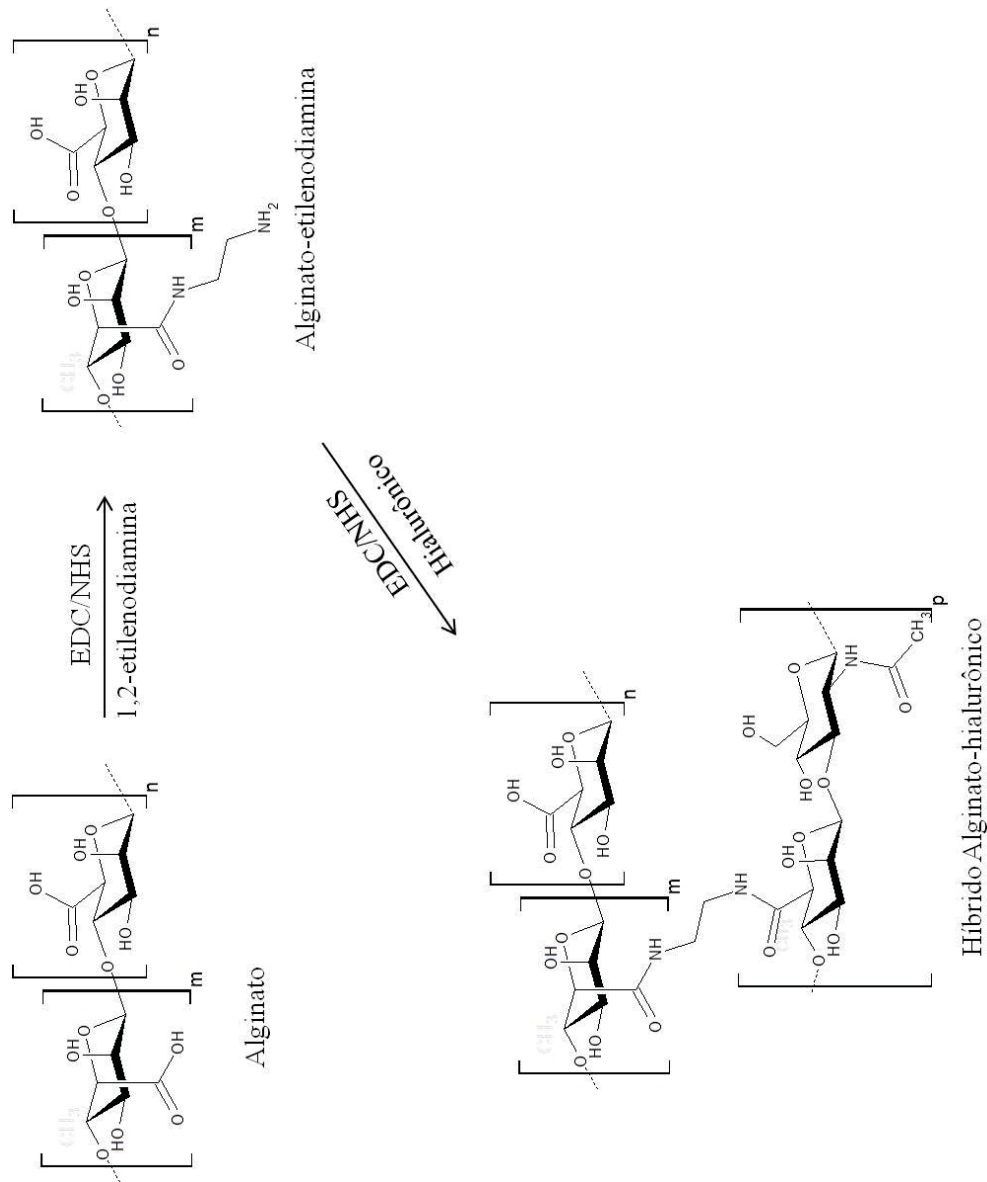
Adicionalmente, a produção de polissacarídeos híbridos é bastante escassa e inexpressiva na literatura, sendo apenas recentemente reportada este tipo de produção.

O alginato é um biomaterial que forma hidrogéis na presença de íons divalentes e tem sido frequentemente utilizado em abordagens de engenharia de tecidos. No entanto, falta-lhe biofuncionalidade na forma de interações com células e proteínas. PARK e colaboradores (2017) reportaram a produção de uma estrutura híbrida de alginato e ácido hialurônico, ligado por meio da 1,2-etilenodiamina, com a finalidade de regeneração de cartilagens. A reação ocorreu em duas etapas de amidação: na primeira etapa as carboxilas do alginato (Alg) foram amidadas utilizando carbodiimida (EDC/NHS) com a 1,2-etilenodiamina (Et), e a segunda etapa foi realizada a amidação das carboxilas do ácido hialurônico (AH) com a extremidade da amina disponível no alginato amidado (Alg-Et), resultando no polissacarídeo híbrido alginato-hialuronato (AH). O híbrido foi caracterizado por meio de análises de RMN de ^1H e FT-IR. Adicionalmente, foram investigados os potenciais condrogênicos de células ATDC5 encapsuladas pelo polissacarídeo, sendo observado que o novo polissacarídeo é capaz de regular a diferenciação condrogênica, mantendo o fenótipo das células. Este resultado abre a perspectiva para inúmeras aplicações na área de regeneração de cartilagens. A FIGURA 28 demonstra a reação de amidação para a formação do polissacarídeo híbrido entre o alginato e o ácido hialurônico (AH).

Outro estudo reportado a semissíntese de híbridos foi realizado por COLODI (2017), no laboratório GLICAM da Universidade Federal do Paraná. Foram produzidos diferentes polissacarídeos híbridos, a partir da ulvana e do produto de hidrólise ácida parcial da *kappa*-carragenana (carrabiose 4²-sulfato).

Inicialmente, foram realizadas a produção dos polissacarídeos híbridos a partir das reações de amidação-aminação redutiva. COLODI (2017), determinou que a ulvana, extraída da *Ulva fasciata*, apresentava 15,7 mol % de díades Ulvanobiurônico tipo A (A_{3s}), que é constituída por unidades [\rightarrow 4) - β -D-GlcAp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap 3-sulfato-(1], concluindo que 15,7% do polissacarídeo era passível de amidação na unidade GlcAp. Após esta determinação, foram realizadas duas reações de amidação com diaminas distintas: 1,3-propanodiamina (DAP) e 1,6-hexanodiamina (HDA), sob as condições: tampão MES 0,2 mol.L⁻¹, pH 4,27, por 3 h, a 30 °C, com 8 mols de EDC, 11 mols de NHS e 40 mols das diaminas DAP e HDA, produzindo respectivamente os intermediários Fd3 e Fd6, os quais apresentaram 46% e 20% das unidades de ácido β -D-glucurônico amidados respectivamente. Estes dados indicaram que 7,2% da ulvana estava amidada com a DAP, enquanto apenas 3,14% estava amidado com HDA. Em seguida estes dois intermediários (Fd3 e Fd6) foram submetidos a reações de aminação redutiva com a carrabiose 4²-sulfato (Kb), sob as condições: 17 mols de Kb, 3 mols de ácido acético, 10 mols de cianoborohidreto de sódio, pH 5, por 15 h a 55 °C, produzindo os polissacarídeos híbridos Fd3-Kb e Fd6-Kb. O híbrido Fd3-Kd apresentou 100% da unidades de β -D-glucurônico amidados, substituídas por Kb (7,2% do polissacarídeo), enquanto Fd6-Kd apresentou 58% das unidades de β -D-glucurônico amidados com HDA substituídas por Kb (1,8% do polissacarídeo). Nas FIGURAS 29 e 30 estão apresentadas as reações e estruturas hipotéticas dos produtos obtidos por COLODI, 2017, tanto os intermediários, como os polissacarídeos híbridos.

FIGURA 28 – REAÇÃO DE SEMISSÍNTESE DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALGINATO-HIALURONATO

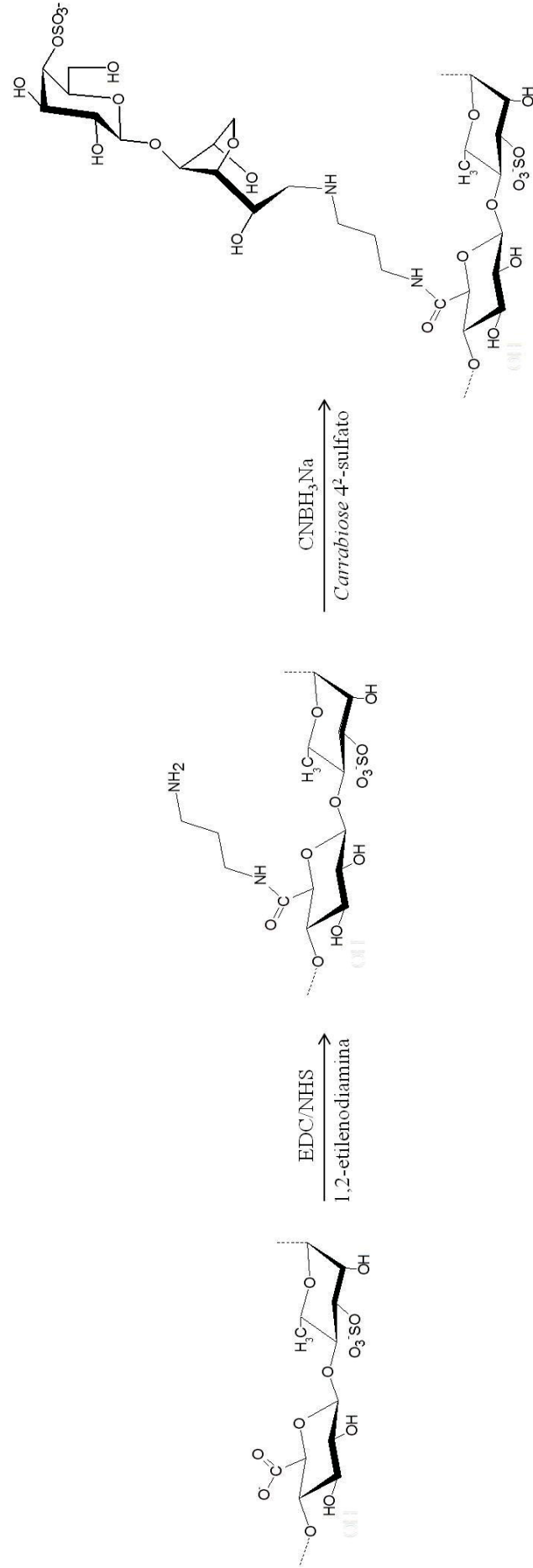


FONTE: O autor (2018).

Outro estudo reportando a semissíntese de híbridos foi realizado por COLODI (2017), no laboratório GLICAM da Universidade Federal do Paraná. Foram produzidos diferentes polissacarídeos híbridos, a partir da ulvana e do produto de hidrólise ácida parcial da *kappa*-carragenana (carrabiose 4²-sulfato).

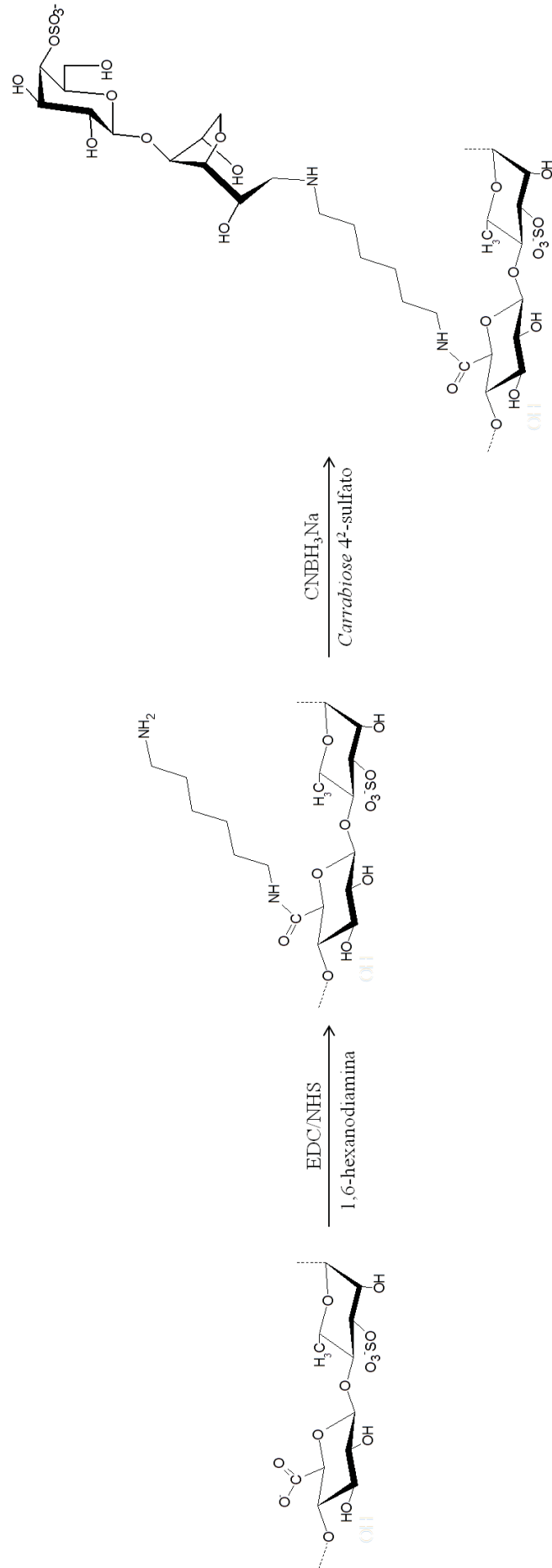
Inicialmente foram realizadas a produção dos polissacarídeos híbridos a partir das reações de amidação-aminação redutiva. COLODI (2017), determinou que a ulvana, extraída da *Ulva fasciata*, apresentava 15,7 mol % de díades Ulvanobiurônico tipo A (A_{3s}), que é constituída por unidades [\rightarrow 4) - β -D-GlcAp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap 3-sulfato-(1], concluindo que 15,7% do polissacarídeo era passível de amidação na unidade GlcAp. Após esta determinação, foram realizadas duas reações de amidação com diaminas distintas: 1,3-propanodiamina (DAP) e 1,6-hexanodiamina(HDA), sob as condições: tampão MES 0,2 mol.L⁻¹, pH 4,27, por 3 horas, a 30 °C, com 8 mols de EDC, 11 mols de NHS e 40 mols das diaminas DAP e HDA, produzindo respectivamente os intermediários Fd3 e Fd6, os quais apresentaram 46% e 20% das unidades de ácido β -D-glucurônico amidados respectivamente. Estes dados indicaram que 7,2% da ulvana estava amidada com a DAP, enquanto apenas 3,14% estava amidado com HDA. Em seguida estes dois intermediários (Fd3 e Fd6) foram submetidos a reações de aminação redutiva com a carrabiose 4²-sulfato (Kb), sob as condições: 17 mols de Kb, 3 mols de ácido acético, 10 mols de cianoborohidreto de sódio, pH 5, por 15 horas a 55 °C, produzindo os polissacarídeos híbridos Fd3-Kb e Fd6-Kb. O híbrido Fd3-Kd apresentou 100% da unidades de β -D-glucurônico amidados, substituídas por Kb (7,2% do polissacarídeo), enquanto Fd6-Kd apresentou 58% das unidades de β -D-glucurônico amidados com HDA substituídas por Kb (1,8% do polissacarídeo). Nas FIGURAS 30 e 31 estão apresentadas as reações e estruturas hipotéticas dos produtos obtidos por COLODI, 2017, tanto os intermediários, como os polissacrídeos híbridos.

FIGURA 29 – REAÇÃO DE SEMISSÍNTESE DOS POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS FD3-KB



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 30 – REAÇÃO DE SEMISSÍNTESE DOS POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS FD6-KB



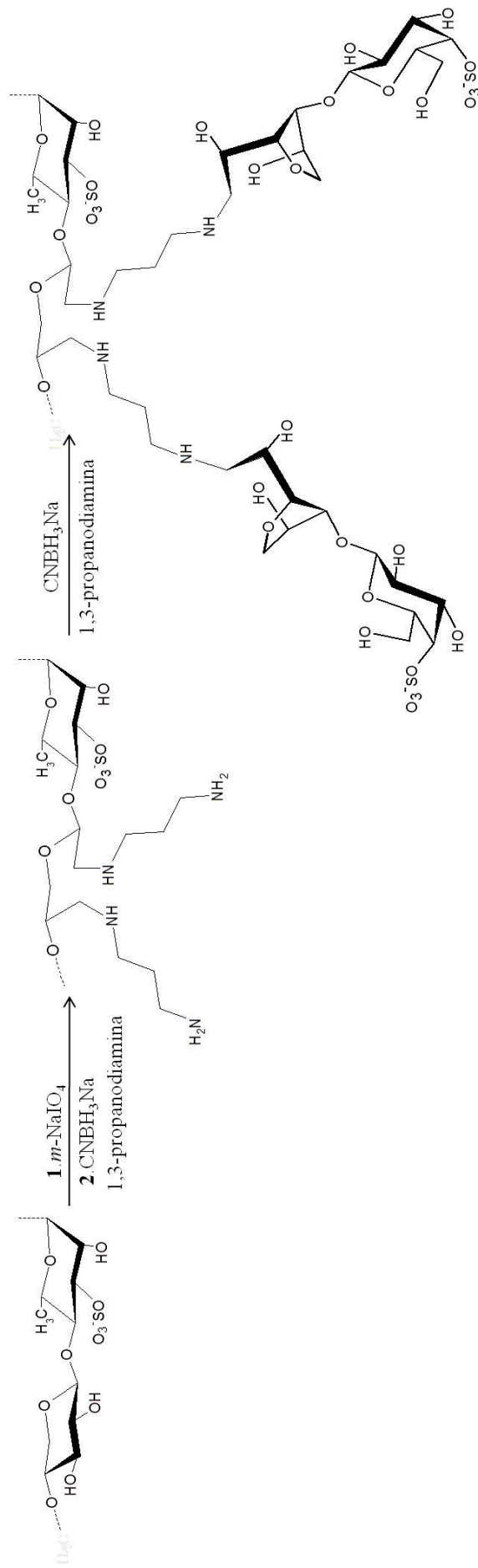
FONTE: O autor (2018).

Adicionalmente, foram produzidos por COLODI (2017) mais dois polissacarídeos híbridos, a partir da ulvana e da carrabiose 4²-sulfato. Além das unidades de ácido urônico, também estão presentes na ulvana unidades de β -D-xilose, as quais apresentam em sua estrutura hidroxilas vicinais. A presença destas hidroxilas vicinais tornam a xilose uma unidade passível de sofrer oxidação com *m*-periodado de sódio (*m*-NaIO₄), uma reação capaz de quebrar a ligação C-C entre estas hidroxilas, dando origem a unidades dialdeídicas. Desta forma COLODI, 2017, realizou inicialmente duas reações sequenciais, oxidação seguida de aminação redutiva: a reação foi conduzida com *m*-NaIO₄ e 13 mols de *m*-NaIO₄, por 72 h a 55 °C. Em seguida foram adicionados os reagentes da reação de aminação redutiva: 170 mols das diamina DAP ou Hdm, 3 mols ácido acético, 10 mols de cianoborohidreto de sódio. A reação foi conduzida por 15 horas a 55 °C, gerando os intermediários Fn3 e Fn6 aminados, respectivamente, apresentando 36 e 26% de modificação a partir do polissacarídeo nativo.

Dando sequência a produção dos polissacarídeos híbridos, estes dois intermediários (Fn3 e Fn6) foram submetidos a reações de aminação redutiva com a carrabiose 4²-sulfato (Kb). As reações foram conduzidas fazendo uso: 1 mol da ulvana-aminada (Fn3 ou Fn6), 8 mols de Kb, 3 mols de ácido acético, 10 mols de cianoborohidreto, pH 5, por 15 h a 55 °C, gerando os produtos Fn3-Kb e Fn6-Kb, respectivamente. Os polissacarídeos híbridos Fn3-Kb apresentaram 100% de substituição dos grupos amino pelo dissacarídeo Kb (36% do polissacarídeo), enquanto Fn6-Kb teve 60% dos grupos amino substituídos por Kb (15% do polissacarídeo). Nas FIGURAS 31 e 32 estão representadas as reações e estruturas hipotéticas dos produtos obtidos por COLODI, 2017, através de reações de oxidação-aminação redutiva e da amidação.

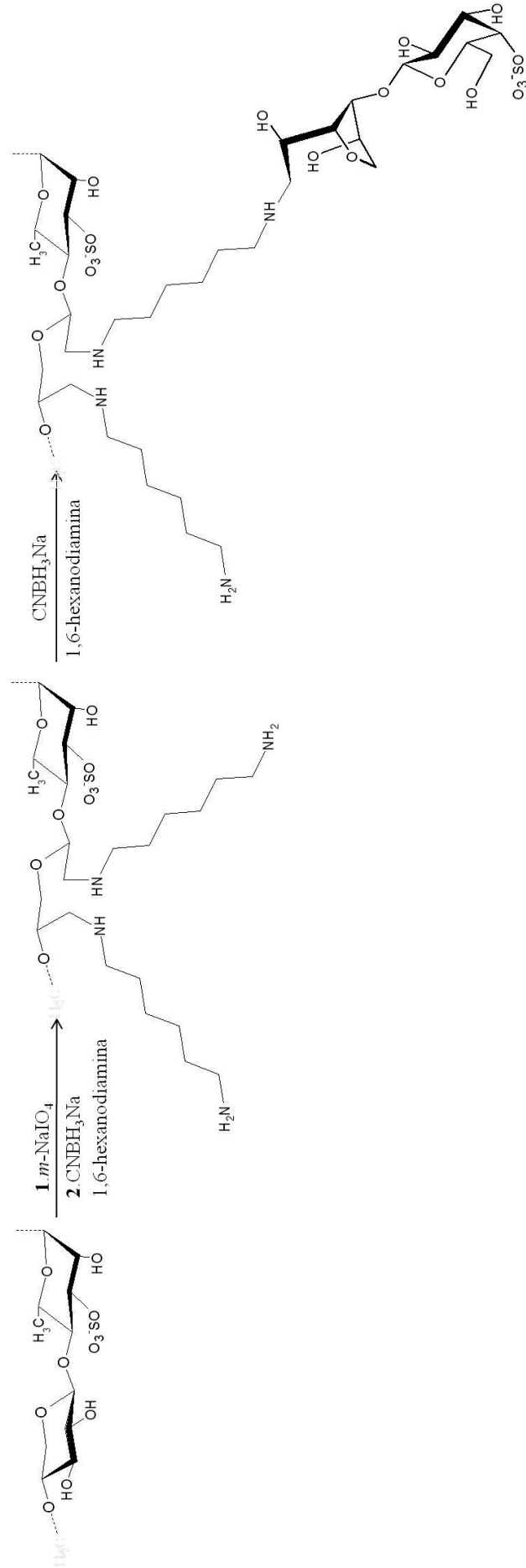
Neste contexto, devido a baixa quantidade de biopolímeros híbridos produzidos por semissíntese relatados na literatura, e o grande potencial deste biomateriais, tanto para aplicações biológicas (atividades), como para sua utilização nas mais diversas áreas, principalmente na biomédica, foi proposto a produção de novos polissacarídeos híbridos a partir do alginato de sódio, *kappa*-carragenana, ulvana e agarose. Estes polissacarídeos foram selecionados por serem polissacarídeos biodisponíveis, de baixo custo, com elevadas taxas de biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de não apresentarem, ou apresentarem baixas níveis de atividades quando testados isoladamente ou sem modificações.

FIGURA 31 – REAÇÃO DE SEMISSÍNTESE DOS POLISSACARÍDEO HÍBRIDO FN3-KB



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 32 - REAÇÃO DE SEMISSÍNTESE DOS POLISSACARÍDEO HÍBRIDO FN6-KB



FONTE: O autor (2018).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

A alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C.Silva, foi cultivada e obtida comercialmente da empresa MM algas, Praia Grande – Angra dos Reis, Rio de Janeiro. A alga verde *Ulva fasciata* Delile foi coletada em Bombinhas – Santa Catarina, identificada pela Prof^a Franciane Maria Pellizzari (UNESPAR, Paranaguá – Paraná). O polissacarídeo comercial alginato de sódio (CAS 9005-38-3), agarose (CAS 9005-38-3), *N,N*-dimetilformamida (DMF), cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC), 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) (CMC), *N*-hidroxisuccinimida (NHS), 1,3-propanodiamina (DAP), cianoborohidreto de sódio (NaBH₃CN), foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. O reagente 2-metil-2-buten-1-ol foi obtido da MERK (Alemanha).

3.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA *K. ALVAREZII*

A alga *K. alvarezii* foi lavada em água corrente, seca à temperatura de 60 °C e moída em moinho de facas. A alga seca e moída foi submetida à extração em solução tampão fosfato 0,025 mol.L⁻¹ (pH 7,0), sob agitação mecânica a 65 °C, por 5 h. Os extratos foram centrifugados (3500 rpm, 20 °C, por 30 minutos), para separação dos resíduos de alga e do sobrenadante. O sobrenadante foi tratado com etanol absoluto (3 volumes) para precipitação dos polissacarídeos, os quais precipitaram na forma de longas fibras, que foram separadas da solução etanólica com o auxílio de um bastão de vidro. Após ressolubilização em água destilada, diálise sequencial contra água destilada, NaCl 1 mol.L⁻¹ e água destilada em membranas de MWCO 12 – 14 KDa, e liofilização originando a fração polissacarídica K.

3.3 SULFATAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO K

3.3.1 Otimização da reação de sulfatação da fração K

A fração K (600 mg) foi resolubilizada em água destilada e dialisada (em membranas de MWCO 12 – 14 KDa) contra solução de cloridrato de trietilamina (3% m/v) durante 12 horas, e liofilizada. A diálise contra solução de cloridrato de trietilamina, visa obter polissacarídeos solúveis no solvente aprótico (DMF anidro), utilizado como solvente nas reações de sulfatação (DE ARAÚJO et al., 2013). Após ser liofilizada, a fração K foi solubilizada em *N,N*-dimetilformamida anidro (DMF anidro) sob agitação e temperatura de 60

°C. Após esta etapa a temperatura foi reduzida para 30 °C nas entradas KS1 e KS2, e mantida a 60 °C na entrada KS3. Em seguida adicionou-se o 2-metil-2-butenol (apenas na entrada KS1), e o agente sulfatante SO₃-Py foi adicionado lentamente. A partir da adição do último reagente a reação seguiu sob agitação e temperatura por 7 horas, sendo interrompida com a adição de uma solução de NaHCO₃ 1,0 mol.L⁻¹ até pH 7, em banho de gelo sob constante agitação, por aproximadamente 10 minutos. O polissacarídeo foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, e centrifugado (3500 rpm, 5 °C, 30 minutos), e ressolubilizado em água destilada. Após diálise sequencial contra água destilada, NaCl 1,0 mol.L⁻¹ e água destilada (MWCO 6-8 KDa), e liofilização, foram obtidas as frações KS1 – KS3.

3.3.2 Semissíntese de KD-O

A fração K (9,6 g) foi separada em três alíquotas (3,2 g) (KS-O1 – KS-O3), e realizadas simultaneamente as reações de sulfatação conforme a entrada KS3. Entretanto, a fração K foi fracionada em alíquotas apenas nas etapas de reação, neutralização e precipitação, pois para as etapas seguintes de tratamento (diálise e liofilização) as alíquotas foram reunidas em uma única fração.

A reação preparativa foi realizada como descrita anteriormente, utilizando o polissacarídeo na forma de sal de trietilamônio, com SO₃-Py, em DMFa a 60 °C por 7 horas. Em seguida as reações foram interrompidas com soluções de NaHCO₃ 1 mol.L⁻¹ em banho de gelo até pH 7. Foram precipitadas com 3 volumes de etanol absoluto, centrifugadas (3500 rpm, 4 °C, por 30 min) e ressolubilizadas em água destilada. As frações KS-O1 – KS-O3 foram reunidas, dialisadas sequencialmente contra água destilada, cloreto de sódio 1 mol.L⁻¹ e água destilada (MWCO 6-8 KDa) e liofilizadas, gerando a fração KS-O.

3.4 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO K

A fração K (7,2 g) foi submetida a hidrólise parcial ácida. Esta fração foi dividida em alíquotas (1,2 g), pois a hidrólise foi realizada em tubo com volume máximo de 200 mL.

A produção da carrabiose 4-sulfato foi realizada conforme metodologia descrita por DUCATTI e colaboradores (2009). Como já era conhecida a metodologia para produção deste dissacarídeo a partir da *k*-carragenana, não foi necessário a realização de uma etapa de otimização. Cada alíquota da fração K (1,2 g) foi inicialmente solubilizada em água destilada (90 mL), e incubada em banho termostaticado (80 – 90 °C). Após a completa solubilização da *k*-carragenana a temperatura foi mantida constante em 80 °C, em seguida adicionado TFA 1,0

mol.L^{-1} (10 mL), resultando em uma concentração final de TFA no meio reacional de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Os tubos permaneceram incubados por 3 h, e ao término os conteúdos foram diluídos (100 mL de água destilada), para cessar a reação. As alíquotas foram reunidas originando uma única fração, que foi evaporada sob pressão reduzida, posteriormente codestilada com água/tolueno e liofilizada originando a fração hidrolisada KD.

3.5 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO KS-O

3.5.1 Curva de hidrólise ácida parcial da fração KS-O

A fração KS-O (1,2 g) foi utilizada para realizar uma curva de hidrólise variando os tempos de reação. A fração KS-O foi solubilizada em água destilada (90 mL) e incubada em banho termostatizado ($80 - 90^\circ\text{C}$). Após a completa solubilização a temperatura foi mantida constante em 80°C , e em seguida adicionado o TFA $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ (10 mL). Foram retiradas alíquotas de 10 mL nos intervalos dos tempos de 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos, denominadas Fr1, Fr2, Fr3, Fr4, Fr5, Fr6 e Fr7, respectivamente. Após cada alíquota ser retirada, foram diluídas com (10 mL de água destilada), evaporadas sob pressão reduzida, codestiladas com água e tolueno e liofilizadas.

3.5.2 Semissíntese da fração KD-OS

A fração KS-O (8,4 g) foi dividida em sete alíquotas (1,2 g), pois a hidrólise foi realizada em tubo de volume máximo de 200 mL. A produção do oligossacarídeo a partir da *kappa*-carragenana persulfatada foi realizada conforme metodologia descrita no item anterior, utilizando o tempo de hidrólise igual a 45 min. Após a adição do TFA $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ (10 mL), os tubos foram incubados em banho termostatizado à 80°C , por 45 minutos, e em seguida diluídos com 100 mL de água destilada e as sete alíquotas foram reunidas. Após a evaporação sob pressão reduzida, codestilação (água e tolueno) e liofilização, originando a fração hidrolisada KD-OS.

3.6 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO ALGINATO DE SÓDIO

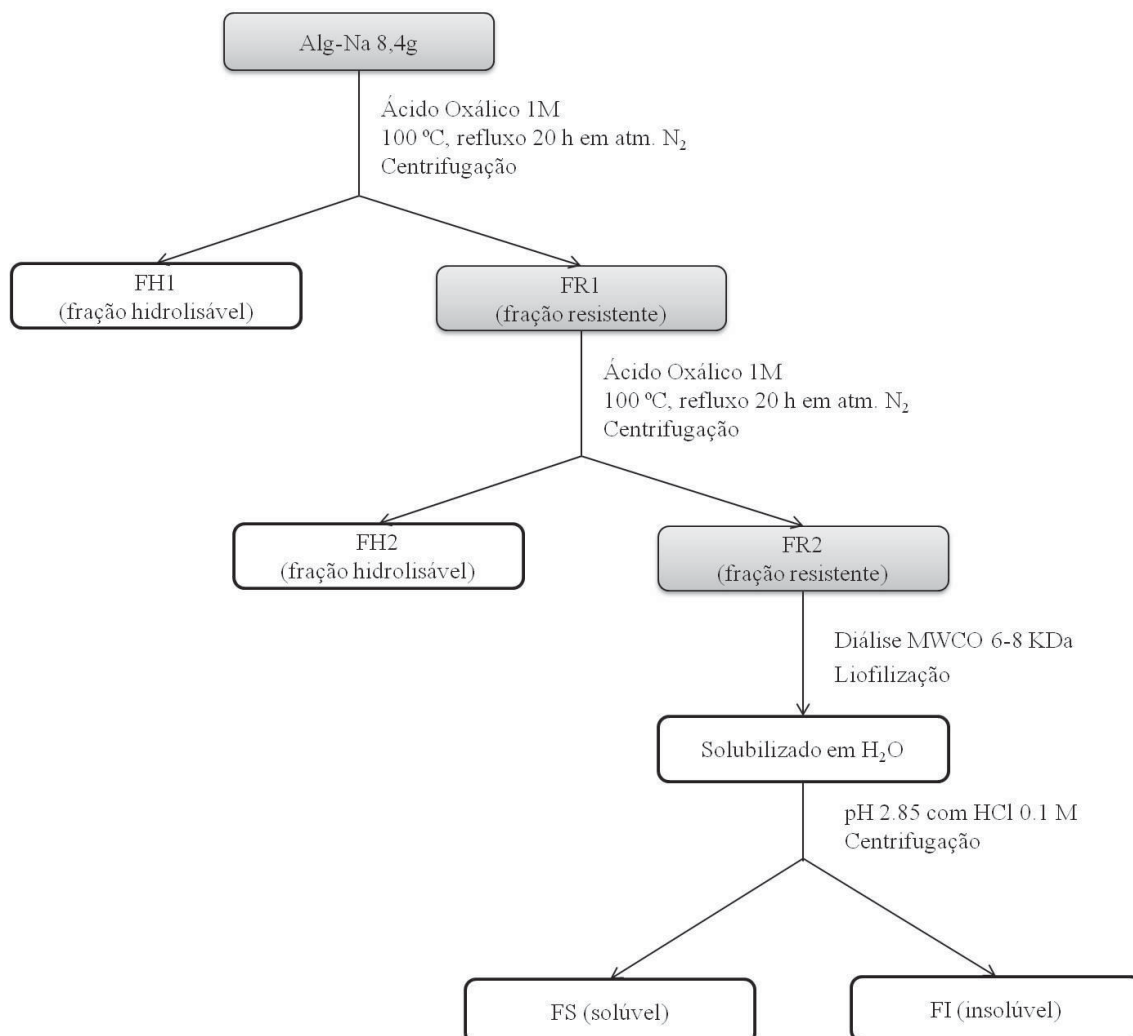
3.6.1 Produção dos blocos BM e BG a partir do alginato de sódio

A obtenção de blocos homopoliméricos constituídos por ácido β -D-manurônico (BM) e ácido α -L-gulurônico (BG), foi realizada de acordo com o método de hidrólise ácida parcial

com ácido oxálico como descrito por HAUG, LARSEN e SMIDSRØD (1966), e demonstrado no fluxograma da FIGURA 33.

O alginato de sódio (8,4 g) foi submetido ao primeiro tratamento com 200 mL de ácido oxálico 1 mol.L⁻¹ por 20 h à 100 ° C, em refluxo. Em seguida o material foi centrifugado gerando duas frações, uma resistente (insolúvel) e outra hidrolisável (solúvel), denominadas FR1 e FH1. A fração FR1 foi novamente submetida a um segundo tratamento semelhante ao primeiro com ácido oxálico 1 mol.L⁻¹ por 20 h à 100 °C. Após a centrifugação foram geradas novamente duas frações: FR2 e FH2, a fração resistente e a hidrolisável respectivamente. A fração FR2 foi dialisada sequencialmente em membranas de MWCO 6-8 KDa contra água destilada, cloreto de sódio 1 mol L⁻¹, água destilada e em seguida foi liofilizada. Esta fração foi novamente solubilizada em água destilada e sob agitação seu pH foi ajustado para 2,85 com HCl 0,1 mol L⁻¹, levando a formação de um precipitado. Após separação por centrifugação (3500 rpm, 4 °C, por 30 min) foram obtidas uma fração solúvel e outra insolúvel. Estas frações tiveram seus pH ajustados para 7, com solução de NaOH 1 mol.L⁻¹, sendo posteriormente dialisadas, em membranas de MWCO 6-8 KDa, e liofilizadas dando origem a duas frações: FS e FI, respectivamente.

FIGURA 33 – FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS BLOCOS HOMOPOLIMÉRICOS E HETEROPOLIMÉRICOS A PARTIR DO ALGINATO DE SÓDIO



FONTE: O autor (2018).

3.6.2 Otimização da reação de amidação dos grupos carboxilas do alginato de sódio utilizando derivados carbodiimidas

As reações de otimização da amidação do alginato de sódio foram realizadas, variando os pHs, o tampão utilizado (MES ou carbonato de sódio), a carbodiimida (*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida (EDC) ou 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) (CMC)), bem como as razões molares de carbodiimida, *N*-hidroxisuccinimida (NHS) e 1,3-propanodiamina (DAP). Adicionalmente, foram mantidas fixas as condições de temperatura (30 °C), concentração do polissacarídeo em solução (1 % m/v), concentração do tampão (0,2 mol.L⁻¹) e tempo de reação (24 h).

As frações foram solubilizadas (1% m/v) em solução tampão ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) em diferentes pH (4,27; 6,5 ou 9,5). Em seguida foi adicionado a DAP e o pH ajustado para o pH específico da reação com HCl 1 mol.L^{-1} (4,27; 6,5 ou 9,5). A carbodiimida (EDC ou CMC) e o NHS foram pesados separadamente e solubilizados no respectivo tampão, e posteriormente foram adicionados às soluções polissacarídicas. O pH foi novamente ajustado para pH específico, e as reações permaneceram sob agitação, e temperatura controlada (30°C) por 24 h. Os produtos das reações foram dialisadas exaustivamente e sequencialmente (em membranas de 6-8 KDa) contra água destilada, cloreto de sódio e água destilada e então foram liofilizadas, originando as frações amidadas respectivas.

3.6.3 Semissíntese de Alg-Dap

A reação preparativa de amidação do alginato de sódio foi realizada conforme a condição A07 do item anterior. Foram utilizadas as relações de 20 mols da 1,3-propanodiamina (DAP), 2 mols da carbodiimida EDC e 1 mol de NHS, para cada mol de Alg-Na. O alginato de sódio foi solubilizado (1% m/v) em solução tampão MES ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) com o pH 6,5. Em seguida foi adicionado a DAP e o pH ajustado para o 6,5 com HCl 1 mol.L^{-1} . A carbodiimida EDC e o NHS foram pesados separadamente e solubilizados em tampão MES (pH 6,5) e em seguida adicionados à solução polissacarídica. O pH foi novamente ajustado para 6,5, e a reação permaneceu sob agitação e temperatura controlada (30°C) por 24 h. Os produtos da reação foi dialisada exaustivamente e sequencialmente (em membranas de 6-8 KDa) contra água destilada, cloreto de sódio e água destilada e então foi liofilizada, originando as a fração amidada Alg-Dap.

3.6.4 Semissíntese de BM-Dap e BG-Dap

As reações de amidação dos blocos BM e BG foram realizadas conforme a reação de produção do Alg-Dap no item 3.6.3, dando origem as frações BM-Dap e BG-Dap, respectivamente.

3.7 SEMISSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS CARBOXILADOS E SULFATADOS VIA AMINAÇÃO REDUTIVA UTILIZANDO OS DERIVADOS DO ALGINATO

3.7.1 Semissíntese de Alg-KD

A reação de aminação redutiva para produção do polissacarídeo híbrido Alg-KD, utilizou a relação de 1 mol de Alg-Dap, para cada 10 mols de KD, e a mesma relação para o agente redutor (10 mols de cianoborohidreto de sódio NaBH_3CN).

A fração Alg-Dap (0,98 mmols) foi solubilizada em água destilada (1% m/v) a 55 °C sob agitação e em seguida foi adicionado a fração KD (9,8 mmols). Após completa solubilização o pH reacional foi ajustado para 6,0 com hidróxido de sódio 8 mol.L^{-1} , em seguida adicionado ácido acético até pH próximo a 4-5, permanecendo sob agitação por 2 h. Posteriormente, foi adicionado o cianoborohidreto de sódio (9,8 mmols) e a reação permaneceu sob agitação e temperatura controlada por 18 h. Após o término da reação, o produto da reação foi dialisado sequencialmente (em membranas de 6-8 kDa), contra água destilada, cloreto de sódio 1 mol.L^{-1} e água destilada e então foi liofilizada, gerando a fração polissacarídica Alg-KD.

3.7.2 Semissíntese de BM-KD1 e BM-KD2

A produção dos polissacarídeos híbridos a partir do Bloco BM, foi similar a produção da fração Alg-KD, entretanto as relações molares entre o bloco BM amidado e o KD foram distintos, conforme apresentado na TABELA 5.

TABELA 5 – CONDIÇÕES REACIONAIS DE AMINAÇÃO REDUTIVA DA FRAÇÃO BM-DAP E KD

Entrada	BM-Dap (mmol)	KD (mmol)	NaBH_3CN (mmol)	Temp. (°C)	Tempo (h)
BM-KD1	0,8	2,0	2,0	55	18
BM-KD2	1,1	11,1	11,1	55	18

FONTE: O autor (2018).

A reação de aminação redutiva para produção do polissacarídeo híbrido da BM-KD1, utilizou a relação de 1 mol de BM-Dap, para cada 2,5 mols de KD, enquanto a reação para produção do polissacarídeo híbrido BM-KD2, utilizou 1 mol de BM-Dap, para cada 10 mols de KD.

3.7.3 Semissíntese de BG-KD1 e BG-KD2

A produção dos polissacarídeos híbridos a partir do Bloco BG, também foi similar a produção da fração Alg-KD, entretanto as relações molares entre o bloco BG amidado e o KD foram distintos, conforme apresentado na TABELA 6.

TABELA 6 – CONDIÇÕES REACIONAIS DE AMINAÇÃO REDUTIVA DA FRAÇÃO AC. GUL-DAP E KD

Entrada	BM-Dap (mmol)	KD (mmol)	NaBH ₃ CN (mmol)	Temp. (°C)	Tempo (h)
BG-KD1	0,4	1	1	55	18
BG-KD2	0,7	7	7	55	18

FONTE: O autor (2018).

A reação de aminação redutiva para produção do polissacarídeo híbrido da BG-KD1, utilizou a relação de 1 mol de BG-Dap, para cada 2,5 mols de KD, enquanto a reação para produção do polissacarídeo híbrido BG-KD2, utilizou 1 mol de BG-Dap, para cada 10 mols de KD.

3.8 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA *U. FASCIATA*

A *Ulva fasciata* foi extraída, caracterizada e a fração polissacarídica F cedida pela Doutoranda Franciely Grose Colodi, para ser utilizada nas modificações químicas neste presente trabalho.

3.8.1 Otimização da reação de amidação dos grupos carboxila da ulvana utilizando carbodiimida

A fração F foi submetida a diferentes reações de amidação as quais foram variadas os pHs reacionais (4,27 e 6,5), a razão molar da carbodiimida EDC:NHS (2:1 e 4:6,6), temperatura (30 e 50 °C) e tempo de reação (3 e 24 h). A concentração de polissacarídeo em solução (1% m/v), a concentração do tampão MES (0,2 mol.L⁻¹), e o número de mmols da 1,3-propanodiamina (DAP) (20 mmols), foram mantidos fixos.

A fração F foi solubilizadas (1% m/v) em solução tampão (0,2 mol.L⁻¹) em diferentes pH (4,27 ou 6,5). Em seguida adicionado a DAP e o pH ajustado para o pH específico (4,27 ou 6,5) da reação com HCl 1 mol.L⁻¹. A carbodiimida EDC e o NHS foram pesados separadamente e solubilizados no respectivo tampão, e posteriormente adicionados às

soluções polissacarídicas. O pH foi novamente ajustado para pH específico, e as reações permaneceram sob agitação e temperatura controlada (30 °C) por 3 ou 24 h. As reações foram dialisadas exaustivamente e sequencialmente (em membranas de 6-8 kDa) contra água destilada, cloreto de sódio e água destilada e então os materiais foram liofilizados, originando a frações amidadas (fração F01 – F06)

3.8.2 Semissíntese de F1D

A reação preparativa de amidação da ulvana (fração F) foi realizada conforme a condição F01. Foram utilizadas as relações de 20 mols da 1,3-propanodiamina (DAP), 4 mols da carbodiimida EDC e 6,6 mol de NHS, para cada mol de ulvana (F). A ulvana foi solubilizada (1% m/v) em solução tampão MES (0,2 mol.L⁻¹) com o pH 4,27. Em seguida adicionado a DAP e o pH ajustado para o 4,27 com HCl 1 mol.L⁻¹. A carbodiimida EDC e o NHS foram pesados separadamente e solubilizados em tampão MES (pH 4,27), e adicionados em seguida à solução polissacarídica. O pH foi novamente ajustado para 4,27 e a reação permaneceu sob agitação e temperatura controlada (30 °C) por 3 h. O produto da reação foi dialisada exaustivamente e sequencialmente (em membranas de 6-8 KDa) contra água destilada, cloreto de sódio e água destilada e então foi liofilizado originando a fração amidada F1D.

3.8.3 Semissíntese de F1KDOS

A reação foi conduzida da seguinte forma: inicialmente a fração F1D (0,2 mmols) foi solubilizada em água destilada a 55 °C, em seguida adicionado a fração KD-OS (2 mmols), e o pH ajustado para 7 com hidróxido de sódio 8 mol.L⁻¹. Posteriormente, o pH foi ajustado para 4-5 com ácido acético concentrado, tendo a reação permanecido sob agitação e temperatura controlada por 2 h. Em seguida foi adicionado o agente redutor cianoborohidreto de sódio (2 mmols), que elevou o pH para 5-6. A reação permaneceu sob a mesma condição de temperatura e agitação por 18 h. O produto resultante foi dialisado (membranas de MWCO 6-8 kDa) contra água destilada, cloreto de sódio 1 mol.L⁻¹ e água destilada novamente, e por fim liofilizado, gerando a fração F1KDOS.

3.9 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA AGAROSE

3.9.1 Semissíntese de Aga-Tos

A agarose (30,3 mmols) previamente reduzida como descrita por HEUKO (2015), foi solubilizada (1 % m/v) em água a 90 °C, sob agitação. A solução foi resfriada a 30 °C e em seguida foram adicionados 25 mL (3100 mmols), gota a gota, de solução de hidróxido de sódio 8 mol.L⁻¹. Após a completa adição foi adicionado a solução de cloreto de tosila (303 mmols) dissolvidos em acetonitrila (184 mL), formando uma mistura heterogênea. A reação permaneceu sob agitação à 30 °C por 14 h. Posteriormente o material foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, centrifugado (3500 rpm, 5 °C, 30 min), resuspendido em água destilada, dialisado sequencialmente contra água destilada, NaCl 1 mol.L⁻¹ e água destilada (MWCO 12–14 kDa) e liofilizado, gerando a fração Aga-Tos.

3.9.2 Semissíntese de Aga-Dap

A agarose tosilada (Aga-Tos), foi submetida a reação de aminação em meio orgânico anidro (DMFa) em presença da DAP. Inicialmente 1,0 g da Aga-Tos (2,17 mmols) foi solubilizada em DMSO a 100 °C. Em seguida foi adicionado a DAP (54,2 mmols) e a reação permaneceu sob agitação à 100 °C por 24 h. Após o término da reação, o material foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, centrifugado (3500 rpm, 5 °C, 30 min), resuspendido em água destilada, dialisado sequencialmente contra água destilada, cloreto de sódio 1 mol.L⁻¹ e água destilada (MWCO 12-14 kDa) e então foi liofilizado, gerando a fração Aga-Dap.

3.10 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.10.1 Dosagens dos grupos O-sulfato

A determinação do teor de grupos O-Sulfato nos polissacarídeos nativos e modificados foi realizada pelo método de DODGSON e PRICE (1962), usando como reagente a mistura gelatina-bário. As amostras foram hidrolisadas com HCl 1 mol.L⁻¹ por 5 horas a 105 °C, para liberação dos grupos sulfato. Ao adicionar à amostra a mistura de gelatina-bário, ocorre a formação do composto insolúvel sulfato de bário, que se mantém em suspensão devido à presença do fluido gelatinoso no meio, resultando em uma turbidez,

medida em espectrofotômetro. A realização da curva padrão consiste em uma solução de sulfato de sódio diluída em HCl 1 mol.L⁻¹ (1 x 10⁻³ g.L⁻¹) e as leituras foram realizadas no comprimento de onda de 360 nm. O método apresenta linearidade entre 20-200 µg de sulfato. A curva padrão foi composta por concentrações de 30, 60, 90, 150 e 190 µg de sulfato de sódio. As amostras utilizadas para a dosagem tiveram suas massas entre 2 - 4 mg, e as análises foram realizadas em triplicata.

O grau de substituição de sulfato (DS) no polissacarídeo da *kappa*-carragenana e seus derivados, foi calculado utilizando a equação 1 (WHISTLER e SPENCER, 1964).

$$DS = \frac{306,27 \times S}{3200 - (102 \times S)} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: 306,27 referente a 1 mol da díade repetitiva (G-DA); 3200 é a massa atômica do enxofre (32 g) x 100; 102 é referente a 1 mol do éster substituinte (SO₃Na) e S representa o teor de enxofre em porcentagem.

3.10.2 Determinação dos teores de nitrogênio e carbono

Os teores de nitrogênio e carbono dos polissacarídeos nativos e modificados foram determinados pela técnica de análise elementar utilizando entre 20 – 30 mg das amostras liofilizadas. Os resultados foram expressos em g % (m/m).

As determinações foram realizadas por combustão em analisador CN, marca ELEMENTAR, modelo VARIO EL III, instalado no Laboratório de Biogeoquímica e Nutrição de Plantas, do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, Setor de Ciências Agrárias (UFPR).

O grau de substituição de amida e amina (DA mol%) nos polissacarídeos derivados do alginato de sódio, seus produtos de hidrólise ácida parcial e da agarose, foram calculados utilizando a equação 2 (TAUBNER; MAROUNEK; SYNYTSYA, 2017).

$$DA = \frac{N.12.6}{C.n.14 - N.c.12} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: N e C são referentes ao percentual de nitrogênio e carbono; n e c são referentes ao número de átomos de nitrogênio e carbono da amina utilizada; Além disso, a equação 2 leva

em consideração as massas moleculares dos átomos de nitrogênio e carbono, sendo 14 e 12 g.mol⁻¹, respectivamente.

3.11 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.11.1 Cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detector de índice de refração e espalhamento de luz em multiângulos (HPSEC-IR-MALLS)

As análises de cromatografia foram realizados em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração (IR) diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WATYIT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP, com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS conectadas em série, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da (colunas Ultrahydrogel 2000, 500, 250 e 120, respectivamente). O eluente utilizado foi uma solução em água ultrapura de nitrito de sódio 0,1 mol.L⁻¹ e azida de sódio 200 ppm, à pressão de 920 psi a 20°C.

Para análise de homogeneidade e determinação da massa molecular ponderal média (M_w), foram preparadas soluções dos polissacarídeos na concentração de 1×10^{-3} g.L⁻¹ em solução de nitrito de sódio mol.L⁻¹ e azida de sódio 200 ppm dissolvidas em água ultrapura. As soluções resultantes foram filtradas em membranas de acetato de celulose (MILLIPORE) de 0,22 µm.

Para determinação da massa molecular ponderal média (M_w) das frações polissacarídicas da fração K nativa e das sulfatadas quimicamente (KS1 – KS3 e KS-OS) tiveram a massa molecular ponderal média (M_w) estimadas por meio das galactanas sulfatadas obtidas por COLODI (2011). Enquanto as frações polissacarídeos do alginato de sódio, seus derivados modificados quimicamente e os polissacarídeos híbridos tiveram a massa molecular ponderal média (M_w) estimadas por meio de curva padrão com dextranas (Sigma-Aldrich).

Tanto os padrões de galactanas sulfatadas (M_w de $51,0 \times 10^3$, $60,1 \times 10^3$, $64,8 \times 10^3$, $86,8 \times 10^3$ e $114,0 \times 10^3$ g.mol⁻¹), como os padrões de dextrana de (M_w de $9,4 \times 10^3$, $40,2 \times 10^3$, $77,8 \times 10^3$, 266×10^3 e 487×10^3 g.mol⁻¹) foram solubilizados no eluente de nitrito de sódio (NaNO₃ 0,1 mol.L⁻¹) e azida de sódio (NaN₃ 200 ppm) em água ultrapura, filtradas em membranas de acetato de celulose (MILLIPORE) de 0,22 µm e injetadas no sistema

cromatográfico. Os cromatogramas foram analisados através do *software* ASTRA versão 450 (WATY TECHNOLOGY).

As curvas padrões de dextrana e galactanas sulfatadas apresentaram os valores de massas molares ponderais médias em escala logarítmica em função dos tempos de retenção. A TABELA 7 apresenta os tempos de retenção (min) e as massas molares ponderais médias dos padrões, bem como as equações de regressão linear utilizadas para estimar as massas molares ponderais médias relativas das moléculas de interesse.

TABELA 7 MASSAS MOLARES PONDERAIS MÉDIAS (MW), TEMPOS DE RETENÇÕES E EQUAÇÃO DE REGRESSÃO LINEAR DAS CURVAS PADRÕES

Padrão	M _w (10 ³ g.mol ⁻¹) ^a	Log M _w	Tr.(min)	Regressão linear ^b
Galactanas sulfatadas ^d				
DSi-1	51,6	4,71	58,1	y= - 0,0301x + 6,4597 R ² = 0,970
DSi-2e	60,1	4,78	56,0	
DSi-3	63,8	4,80	55,0	
DSi-4	86,8	4,94	49,3	
DSi-5	114,0	5,06	47,6	
Dextrana				
D-5251	487	5,69	44,67	y= - 0,1741x + 13,367 R ² = 0,988
D-7265	266	5,42	45,17	
D-4751	77,8	4,89	48,83	
D-4133	40,2	4,60	49,92	
D-9260	9,4	3,97	54,17	

^a Massas molares ponderais médias especificadas por COLODI (2011) (galactanas sulfatadas) e pelo fabricante (dextranas); ^b As equações obtidas por regressão linear expressam $y = \log M_w$, $x =$ tempo de retenção (min) e o coeficiente de determinação (R^2); ^d COLODI, 2011. FONTE: O Autor (2018).

3.12 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.12.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR/FTIR)

A obtenção dos espectros na região do infravermelho foi realizada no espectrômetro ALPHA Bruker, com transformada de Fourier, no Departamento de Farmácia, Setor de

Ciências da Saúde (UFPR). O processamento e interpretação dos espectros foram realizados através do *software Opus viewer* (Bruker).

3.12.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas no Centro de RMN da UFPR, instalado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, no Setor de Ciências Biológicas e Departamento de Química, no Setor de Exatas. Os espectros de RMN foram obtidos em três espectrômetros: Bruker AVANCE III 600 de campo magnético de 14,095 Tesla (600 MHz); Bruker AVANCE 400 de campo magnético 9,4 Tesla (400 MHz) e Bruker DPX 200 de campo magnético 4,7 Tesla (200 MHz).

Os espectros de carbono (^{13}C) foram obtidos nos equipamentos Bruker AVANCE 400 de 9,4 Tesla (400 MHz) e Bruker DPX 200 de 4,7 Tesla (200 MHz), operando na frequência base de 100 e 50 MHz, respectivamente. Enquanto as análises de RMN monodimensionais de hidrogênio (^1H) e bidimensionais (COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$; TOSCY $^1\text{H} - ^1\text{H}$; HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ e HSQC-editado $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) foram realizadas nos espectrômetros de Bruker AVANCE III 600 de campo magnético de 14,095 Tesla (600 MHz); Bruker AVANCE 400 de campo magnético 9,4 Tesla (400 MHz). Todas as análises utilizaram tubos de 5 mm de diâmetro. Todas as frações derivadas da *kappa*-carragenana, alginato de sódio e ulvana foram solubilizadas em água deuterada 99% (D_2O) (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.). Os deslocamentos químicos expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como padrão interno, 30,2/2,224 ppm para carragenanas e agarose, 31,45/2,10 ppm para o alginato de sódio e seus derivados (HEYRAUD et al., 1996) e 31,45/2,225 ppm para ulvanas. Enquanto a agarose reduzida (Aga-Reduzida) e a tosilada (Aga-Tos) foram solubilizadas em dimetilsulfoxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) e os deslocamentos químicos expressos em ppm, foram determinados utilizando o próprio $\text{DMSO}-d_6$ como padrão interno (41,53/2,696 ppm). Adicionalmente, as análises foram realizadas a temperatura de 70 °C, e os dados de RMN foram processados e analisados com o software TopSpin 3.1 (Bruker).

3.12.3 Análises de RMN monodimensionais

a) Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos na frequência base de 100,16 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas de 4.000 – 70.000 aquisições,

utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. As amostras foram solubilizadas em D₂O, na concentração de aproximadamente 50 mg.mL⁻¹.

b) Ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de ¹H)

Para os espectros de RMN de ¹H foi necessário promover a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a completa remoção das moléculas de água presentes, através da dissolução das frações em D₂O, congelamento e liofilização (sendo esse processo foi repetido por no mínimo duas vezes), com a finalidade de diminuir a intensidade do sinal relativo ao hidrogênio ligado a oxigênio, o qual prejudica a qualidade do espectro obtido. As amostras foram solubilizadas em D₂O pura na concentração de aproximadamente 20 mg.mL⁻¹.

3.12.4 Análises de RMN bidimensionais

O preparo de todas as amostras para análises de RMN bidimensionais(COSY, TOSCY, HSQC, HSQC-editado e HSQC-TOSCY) seguiram o mesmo protocolo de preparo que as amostras analisadas em RMN de ¹H.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este tópico foi dividido em quatro itens:

- Kappa-carragenana – extração, caracterização, sulfatação química e produção de oligossacarídeos;
- Alginato de sódio – caracterização, produção de blocos homopoliméricos, amidação e semissíntese de polissacarídeos híbridos;
- Ulvana – amidação e semissíntese de polissacarídeo híbrido;
- Agarose – caracterização, tosilção e aminação.

4.1 KAPPA-CARRAGENANA – EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, SULFATAÇÃO QUÍMICA E PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

A partir da macroalga marinha *Kappaphycus alvarezii*, foi obtida a fração polissacarídica K com rendimento de 31 g (51,7% de rendimento em relação ao material de partida seco). O rendimento de extração dos polissacarídeos da *K. alvarezii*, está de acordo com os obtidos em outras extrações a partir da *K. alvarezii* pelo grupo de pesquisa (COLODI, 2017; ARAÚJO, 2012; COLODI, 2017; DUCATTI, 2009; DOS SANTOS, 2015).

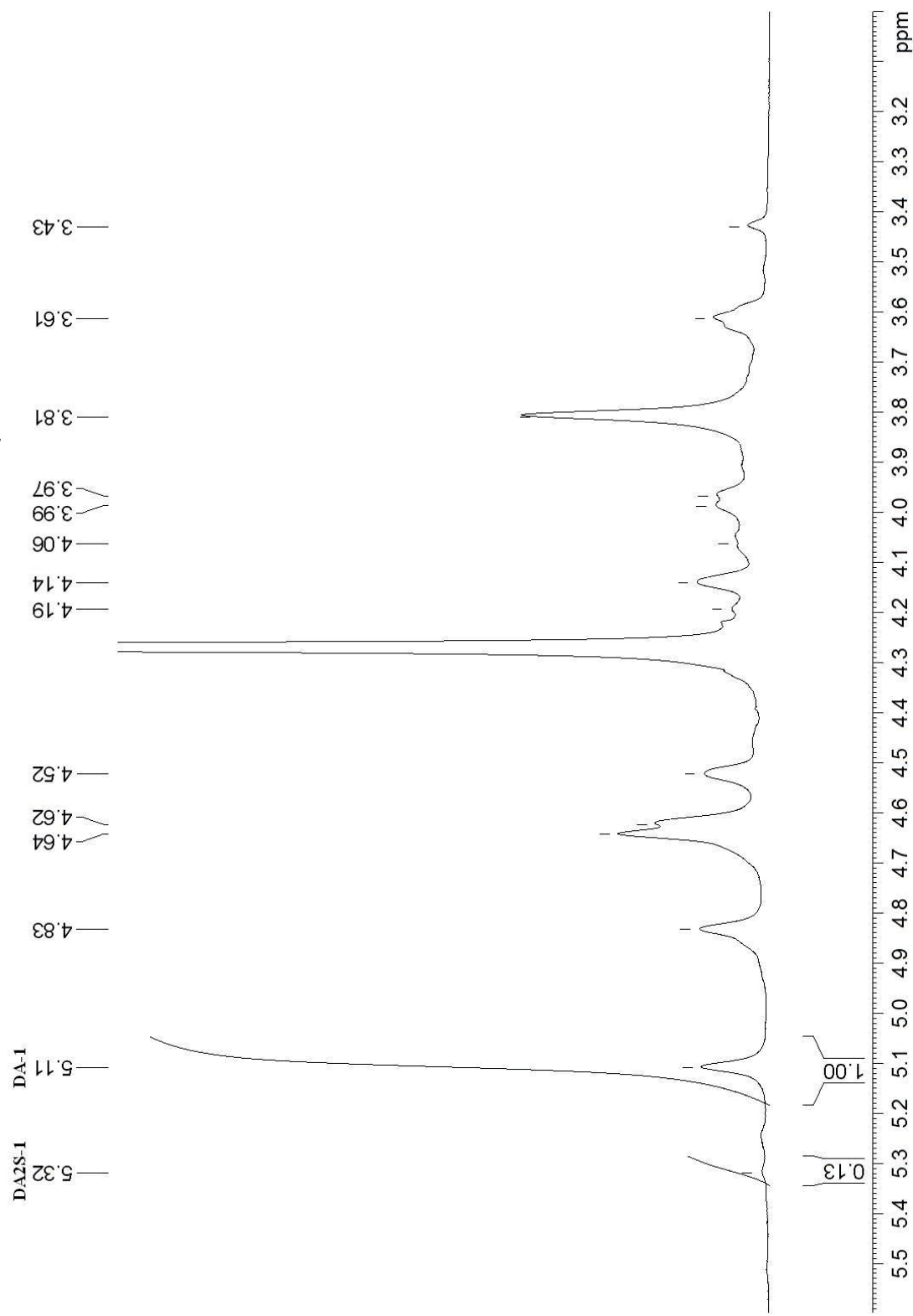
4.1.1 Caracterização química e espectroscópica da fração K

A fração polissacarídica K, foi analisada por RMN de ^{13}C , ^1H e HSQC, fornecendo espectros idênticos aos reportados na literatura para polissacarídeos extraídos da *K. alvarezii* (COLODI, 2017; DOS SANTOS, 2015; DUCATTI, 2005; VAN DE VELDE et al., 2002; VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004; DE ARAUJO et al., 2013).

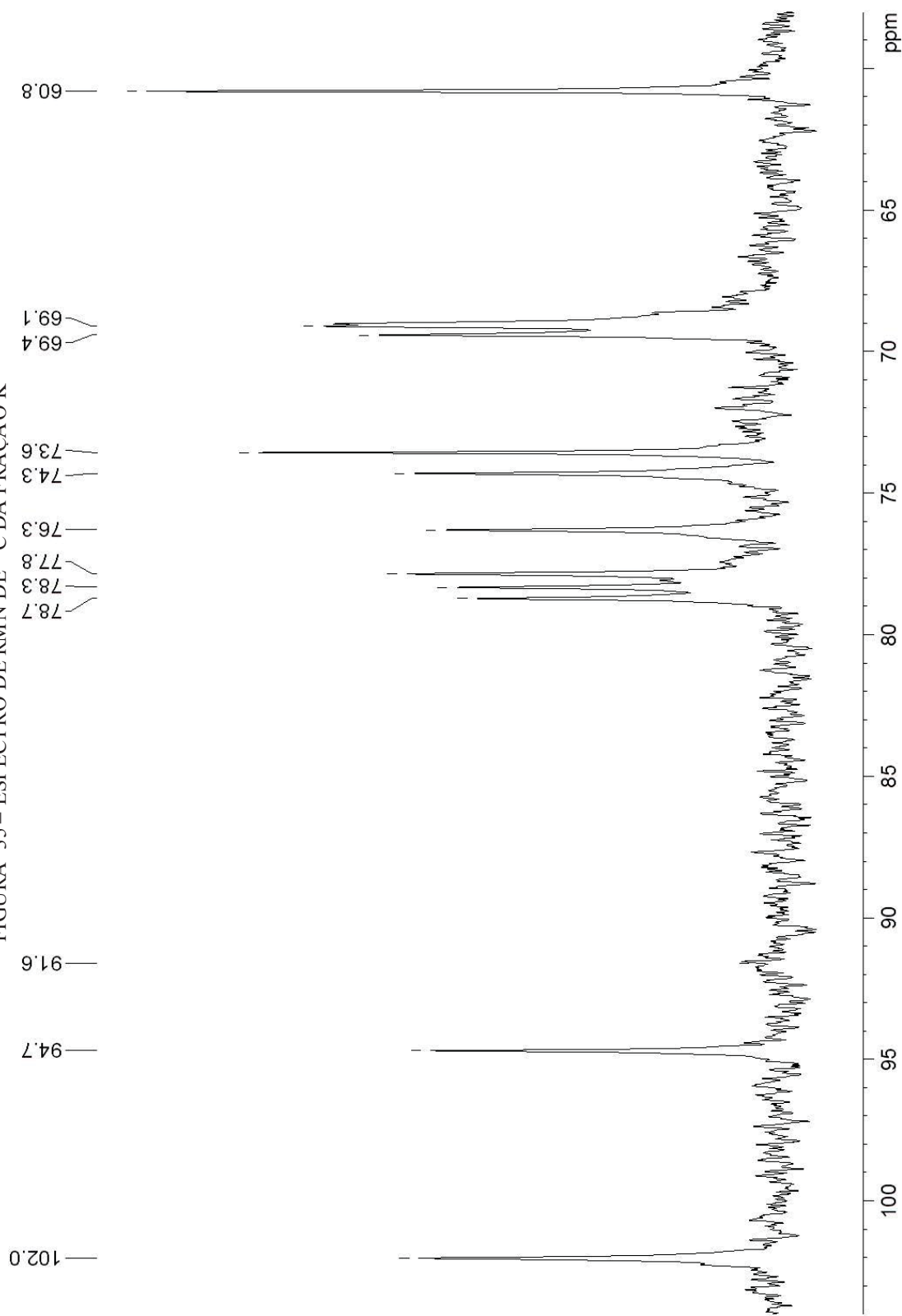
No espectro de RMN de ^1H da fração K (FIGURA 34), estão presentes dois sinais α -anoméricos, em 5,11 e 5,32 ppm correspondentes as unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (DA) e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato (DA2S), respectivamente (VAN DE VELDE et al., 2002; CIANCIA et al., 1993). Através da análise das proporções obtidas pela integração destes dois sinais no espectro de RMN de ^1H , a fração K apresentou 87% de unidades DA e 13% de unidades DA2S, as quais constituem as díades da *kappa*-carragenana (G4S-DA) e *iota*-carragenana (G4S-DA2S), respectivamente. Além disto, foi identificado o sinal em 3,43 ppm atribuído aos prótons metílicos de unidades 6-*O*-metil- β -D-galactopiranosose 4-sulfato (ESTEVEZ; CIANCIA; CEREZO, 2004; USOV, 1984).

No espectro de RMN de ^{13}C e HSQC (FIGURAS 35 e 36) da fração K, foram assinalados os carbonos e hidrogênios da díade majoritária que compõem a *kappa*-carragenana. As correlações anoméricas, em 102,0/4,64 ppm e 94,7/5,10 ppm, correspondem as unidades 3-*O*-substituídas de β -D-galactopiranosose 4-sulfato (G4S) e 4-*O*-substituídas de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (DA), respectivamente (VAN DE VELDE et al., 2002).

Destaca-se que estes resultados estão de acordo com os obtidos na literatura onde a espécie *Kappaphycus alvarezii* sintetiza majoritariamente carragenanadas do tipo *kappa*, onde há a presença de baixas porcentagens de díades de *iota*-carragenana e de unidades de β -D-Galp parcialmente *O*-metiladas em C6.

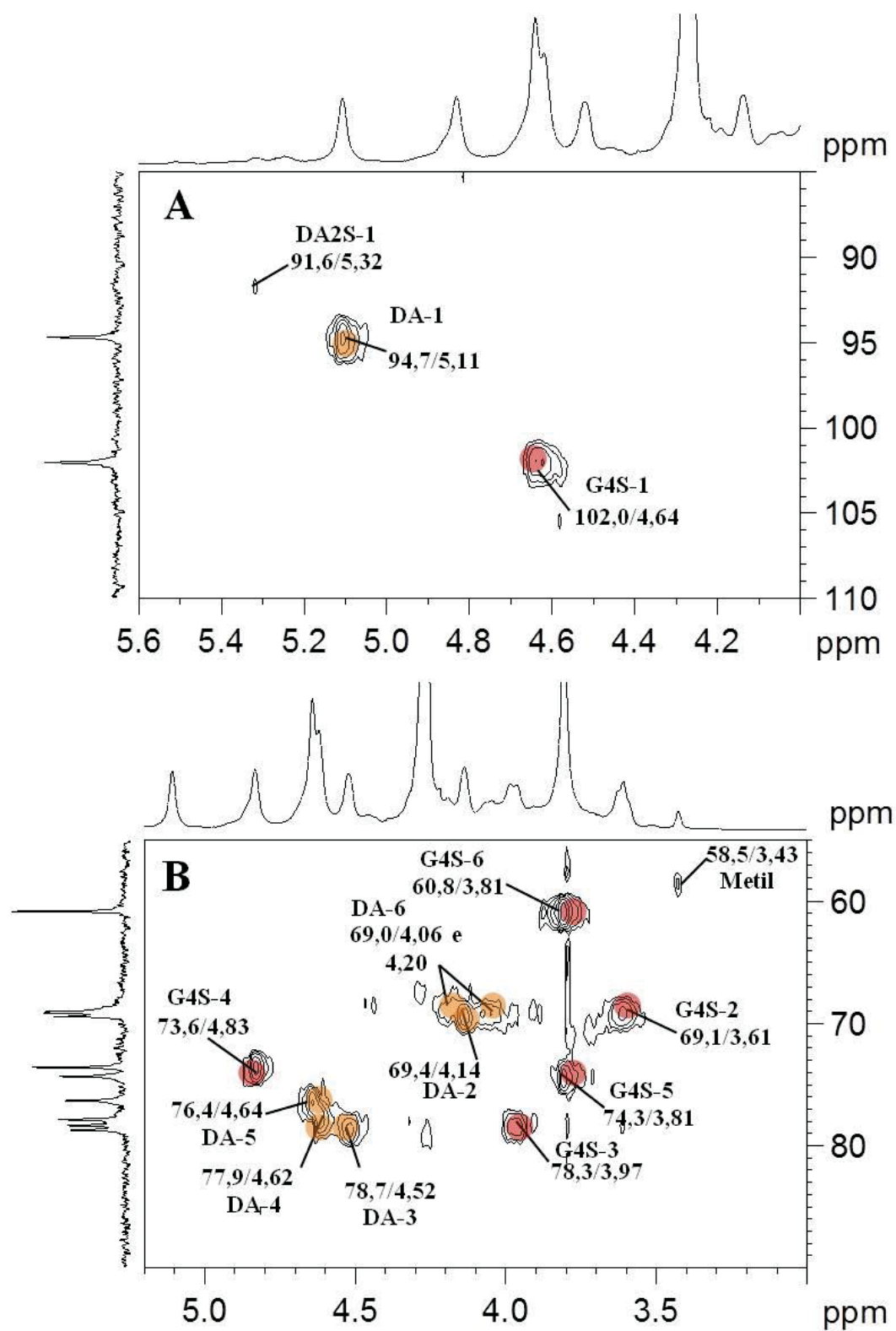
FIGURA 34 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO K

FONTE: O autor (2018).

FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO K

Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (30,2 ppm). FONTE: O autor (2018).

FIGURA 36 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO K. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6)



Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (30,2/2,224). Após a nomenclatura de KNUSTEN et al., 1996, o número refere-se à posição dos C/H da respectiva unidade. G4S, DA e DA2S = unidades de β-D-galactopiranosse 4-sulfato, 3,6-anidro- α-D-galactopiranosse e 3,6-anidro- α-D-galactopiranosse 2-sulfato, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

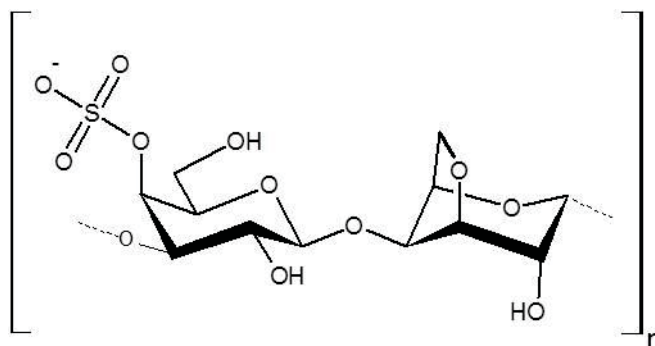
Os assinalamentos dos C/H referente a díade $[\rightarrow 3)\beta\text{-D-Galp-4-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-3,6-anidro-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow]$ (FIGURA 37) que constitui a *kappa*-carragenana, estão apresentados na TABELA 8. Adicionalmente, estes assinalamentos de RMN foram realizados com diferentes valores para a referência interna (acetona), como demonstrado a seguir.

TABELA 8 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DA FRAÇÃO F

Unidade		C/H ^a	C/H ^b
G4S	1	102,0/4,64	103,2/4,52
	2	69,1/3,61	70,3/3,49
	3	78,3/3,97	79,6/3,85
	4	73,6/4,83	74,8/4,71
	5	74,3/3,81	75,6/3,69
	6	60,8/3,81	62,0/3,69
DA	1	94,7/5,11	96,0/4,99
	2	69,4/4,14	70,6/4,02
	3	78,7/4,52	79,9/4,40
	4	77,9/4,62	79,1/4,49
	5	76,4/4,64	77,6/4,52
	6	69,0/4,06 e 4,20	70,2/3,94 e 4,08

^{a,b} calibração do padrão interno acetona: 30,2/2,224 e 31,45/2,10 ppm, respectivamente.

FIGURA 37 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA DÍADE $[\rightarrow 3)\beta\text{-D-Galp-4-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-3,6-anidro-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow]$



FONTE: O autor (2018).

Através da dosagens dos grupos *O*-sulfato foi determinado que a *k*-carragenana isolada da *K. alvarezii* apresenta 22,1% de grupos sulfato, correspondentes a 7,9% de enxofre

(TABELA 9). Através do cálculo descrito por WHISTLER e SPENCER (1964), foi calculado um DS total para fração K de 1,01. Considerando que o valor teórico de DS para *k*-carragenana é 1, este valor de DS de 1,01 pode ser atribuído a presença de díades correspondentes a *iota*-(G4S-DA2S) presente em menor quantidade na fração K.

TABELA 9 – ANÁLISE DE SULFATO NA FRAÇÃO K

Fração	SO ₄ ^{-a} (%)	NaSO ₃ (%)	S (%)	DS ^b
K	22,1	23,7	7,90	1,01

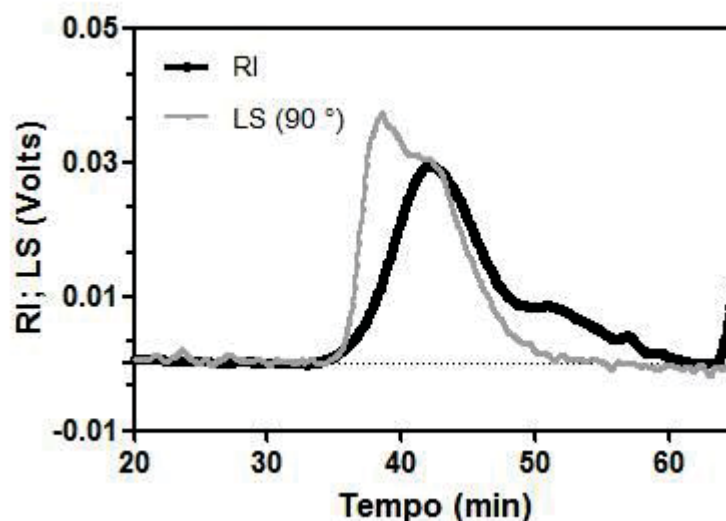
a,b determinações de acordo com os métodos de Dodgson (1961) e Whistler e Spencer (1964).

A FIGURA 38 ilustra o perfil de eluição em HPSEC-MALLS-RI da fração polissacarídica K. O perfil de eluição detectado demonstra um caráter polidisperso para este polissacarídeo, indicando a presença de moléculas com diferentes massas moleculares, inviabilizando a determinação do Mw da fração K através da taxa de variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc).

Desta forma a determinação do Mw da fração K foi realizada através da curva padrão de galactanas sulfatadas, pois o equipamento de HPSEC realiza a separação das moléculas não apenas pela massa molecular absoluta, e sim levando em consideração o volume hidrodinâmico que as moléculas ocupam em solução (SPICHTIG; AUSTIN, 2008). Não sendo indicado a determinação do Mw de carragenanas utilizando curvas padrões de dextranas ou pululanas (GÓMEZ-ORDÓÑEZ; JIMÉNEZESCRIG; RUPÉREZ, 2012), pois são polissacarídeos lineares ligados através de ligações glicosídicas (1→6).

Deste modo a massa molar ponderal média (M_w) foi estimada em $1,5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, estando de acordo com os dados reportados na literatura para a *k*-carragenana calculados através do espalhamento de luz: $2,1 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ (DE ARAÚJO et al., 2013), $1,98 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ (DOS SANTOS, 2015); $4,93 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ (KOHYAMA; SANO; NISHINARI, 1996); $5,2 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ (MYSLABODSKI; STANCIOFF; HECKERT, 1996).

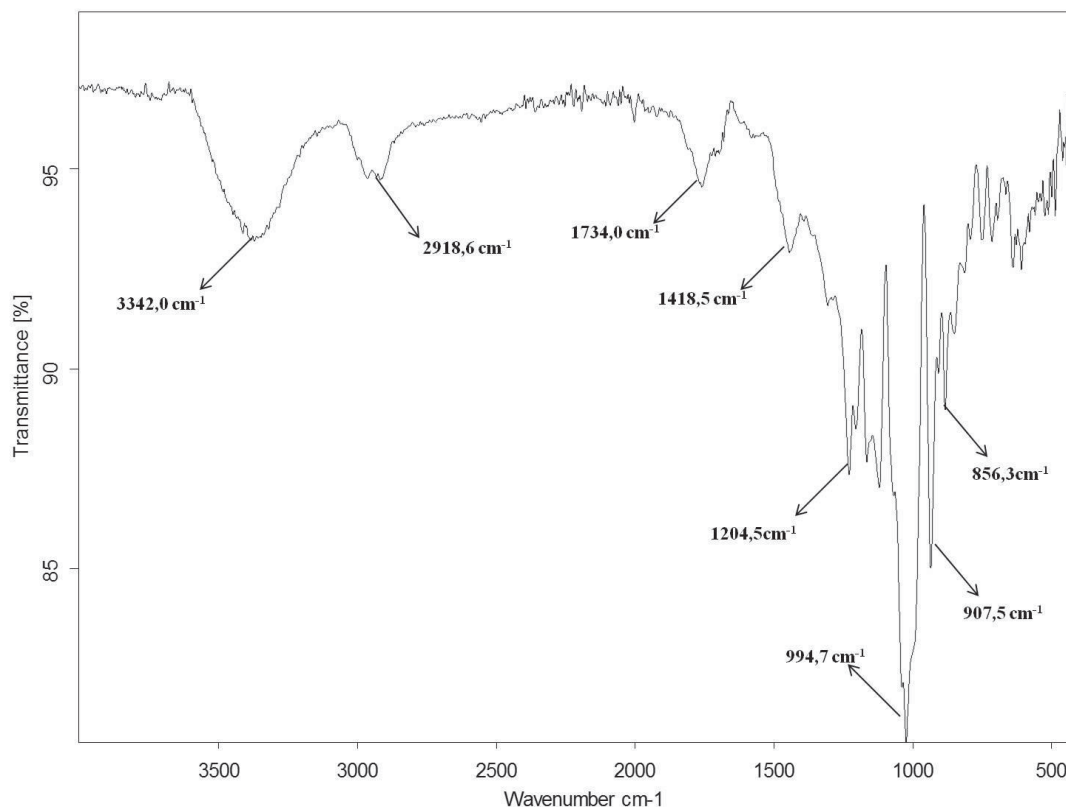
FIGURA 38 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO K



RI: *refractive index*; LS: *Laser-light scattering* FONTE: O autor (2018).

O espectro de infravermelho da fração K (FIGURA 39) apresentou bandas características como: $3342,0\text{ cm}^{-1}$ (O-H estiramento vibracional), $2918,6\text{ cm}^{-1}$ (C-H estiramento vibracional), $1204,5\text{ cm}^{-1}$ (O=S=O estiramento vibracional assimétrico do grupo sulfato), $994,7\text{ cm}^{-1}$ (ligação glicosídica), $907,5\text{ cm}^{-1}$ (estiramento vibracional da ligação C-O-C das unidades de 3,6-anidrogactose) e a banda em $856,3\text{ cm}^{-1}$ (C4-O-S estiramento vibracional do grupo sulfato das unidades β -D-galactopirranose) (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003; SEKRAL; LEGRAND, 1993).

FIGURA 39 – ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DA FRAÇÃO K



Wavenumber: número de onda; Transmittance: transmitância. FONTE: O autor (2018).

Desta forma, através das análises de RMN, teor de sulfato e FTIR, foi confirmado que a fração K é constituída majoritariamente por carragenana do tipo *kappa*.

4.1.2 Otimização da reação de sulfatação da fração K

A fração K foi submetida a sulfatação química utilizando o trióxido de enxofre-piridina, com a finalidade de posterior obtenção de oligossacarídeos sulfatados, com diferentes padrões de sulfatação.

O trióxido de enxofre é um reagente que vem sendo muito utilizado em reações de sulfatação química. Entretanto por ser um reagente eletrofilo agressivo, reage rapidamente com compostos que contenham grupos doadores de elétrons, além de produzirem reações extremamente exotérmicas. A fim de diminuir a velocidade de reação e liberação de calor, este composto é utilizado em conjunto com agentes complexantes (piridina, trietilamina, N,N-diisopropilamina), pois diminuem a reatividade do trióxido de enxofre por estarem complexados a bases fracas, como é o caso da piridina, no complexo piridina-trióxido de enxofre (SO₃-Py) (BEDINI et al., 2017; DE FREITAS et al., 2015b).

DE ARAÚJO e colaboradores (2013) realizaram reações de sulfatação da *kappa*-carragenana em DMFa, utilizando dois agente sulfatantes diferentes ($\text{SO}_3\text{-Py}$ e $\text{SO}_3\text{-Me}_3\text{N}$). Foram variados os tempos de reação (1, 7, 8 e 24 h), e o polissacarídeo testado na forma de sal de trietilamônio e sódio. Além disto, as reações foram realizadas com o uso do reagente 2-metil-2-butenos. Após análise dos resultados obtidos, os autores constataram que a condição reacional capaz de persulfatar a *kappa*-carragenana, foi o uso do polímero na forma de sal de trietilamônio, em DMFa, com $\text{SO}_3\text{-Py}$ e 2-metil-2-butenos, por 7 h a temperatura ambiente.

É relatado na literatura que o reagente 2-metil-2-butenos em reações de sulfatação é capaz minimizar as reações de despolimerização e clivagem de grupos ácidos lábeis (PAPY-GARCIA et al., 2005).

Embora seja relatado na literatura que a presença da piridina complexada com o trióxido de enxofre, possa limitar parcialmente o caráter altamente ácido deste reagente, responsável pelas múltiplas reações secundárias, como a clivagem de grupos funcionais ácidos lábeis e a despolimerização parcial. Desta forma, a introdução de um eliminador de ácido com natureza neutra, 2-metil-2-butenos, na reação antes da adição do agente de sulfatação, é supostamente responsável por eliminar o ácido livre produzido no sistema em tempo hábil e levaria a uma reação mais eficiente, com reações secundárias diminuídas (PAPY-GARCIA et al., 2005; TU et al., 2011). Entretanto não se sabe se esta seria a única função do reagente 2-metil-2-butenos, pois além de evitar o processo de despolimerização, poderia também facilitar o ataque do oxigênio nucleofílico das hidroxilas ao grupo sulfato (eletrofílico).

Deste modo, com a condição de persulfatação previamente estabelecida por DE ARAÚJO e colaboradores (2013) para persulfatar a *kappa*-carragenana, no presente trabalho foram realizadas três novas reações, variando dois parâmetros não estudados pelos autores (DE ARAÚJO et al., 2013) no processo de otimização das condições de persulfatação da *k*-carragenana, a temperatura e a presença do reagente 2-metil-2-butenos. O aumento da temperatura foi testado a fim de avaliar se o aumento da temperatura reacional poderia facilitar o ataque nucleofílico. A presença ou ausência do 2-metil-2-butenos, foi realizada a fim de avaliar sua função em minimizar a despolimerização do material.

Desta forma as reações foram realizadas mantendo constante a quantidade de $\text{SO}_3\text{-Py}$, e o tempo reacional já estabelecido por DE ARAÚJO e colaboradores (2013). As reações foram conduzidas como demonstrado na TABELA 10.

Para os cálculos estequiométricos utilizados nas reações de sulfatação, foi considerada a massa da díade [$\rightarrow 3$]- β -D-Galp 4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp-(1 \rightarrow) na forma sódica ($409,0 \text{ g.mol}^{-1}$).

A fração K, na forma de sal de trietilamônio foi solubilizada em DMFa com agitação e temperatura de 60°C . Após esta etapa, a temperatura foi reduzida para 30°C quando necessário (entradas KS1 e KS2). Em seguida adicionou-se o 2-metil-2-butenol (apenas na entrada KS1), e o agente sulfatante $\text{SO}_3\text{-Py}$. A partir da adição do último reagente a reação seguiu sob agitação e temperatura por 7 h, sendo interrompida com a adição de uma solução de NaHCO_3 $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ até pH 7, em banho de gelo sob constante agitação, por aproximadamente 10 minutos. O polissacarídeo foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, e centrifugado (3500 rpm, 5°C , 30 min), e ressolubilizado em água destilada. Após diálise sequencial contra água destilada, cloreto de sódio $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e água destilada (MWCO 6-8 KDa) os produtos foram liofilizados, sendo obtidas as frações KS1 – KS3.

TABELA 10 - OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PERSULFATAÇÃO DA KAPPA-CARRAGENA NA

Entrada	Fração K (mmol)	$\text{SO}_3\text{-Py}$ (mmol)	2-metil-2-butenol (mL)	Temp. ($^\circ\text{C}$)	Rend' (%)
KS1	0,5	13	60	30^a	160,0
KS2	0,5	13	-	30	121,1
KS3	0,5	13	-	60^b	115,7

^{a,b} DE FREITAS et al., 2015. FONTE: O autor (2018).

Nas três reações foi obtido um aumento na massa final quando comparada com a massa do polissacarídeo inicial, sendo mais significativo na entrada KS1, onde foi utilizado o reagente 2-metil-2-butenol à 30°C .

Os produtos destas reações (KS1 –KS3) foram analisadas através de RMN de HSQC. Na FIGURA 40 estão apresentados simultaneamente os espectros da fração K nativa e as frações sulfatadas quimicamente KS1 – KS3. Os espectros das três amostras sulfatadas quimicamente são muito similares, apresentando uma grande variação nos deslocamentos químicos quando comparados com o espectro da fração K.

A sulfatação na posição C2 das unidades β -D-galactopiranosose 4-sulfato, ocasionou um deslocamento químico de 69,1/3,61 para 76,6/4,40 ppm (efeito alfa $+7,5/+0,79$ ppm). Os sinais referentes às posições C1 e C3, desta mesma unidade sulfatada, apresentaram deslocamentos químicos de 100,4/4,84 e 74,2/4,13 ppm, correspondentes ao efeito beta de

-1,6/+0,2 e -4,1/+0,16 ppm, respectivamente (DE ARAÚJO et al., 2013; THÀNH et al., 2001; USOV, 1984). Adicionalmente, a sulfatação no carbono-6 gerou um deslocamento químico de 60,8/3,81 para 67,6/4,29 ppm (efeito alfa +6,8/+0,48 ppm), o que ocasionou deslocamento no C5/H5 de 74,3/3,81 para 72,2/4,07 ppm (efeito beta de -2,1/+0,26 ppm) (DE ARAÚJO et al., 2013; LIAO et al., 1996; THÀNH et al., 2001; USOV, 1984). Na posição C4/H4 houve deslocamento do próton, de 73,6/4,83 para 73,5/5,00 ppm (THÀNH et al., 2001; USOV, 1984).

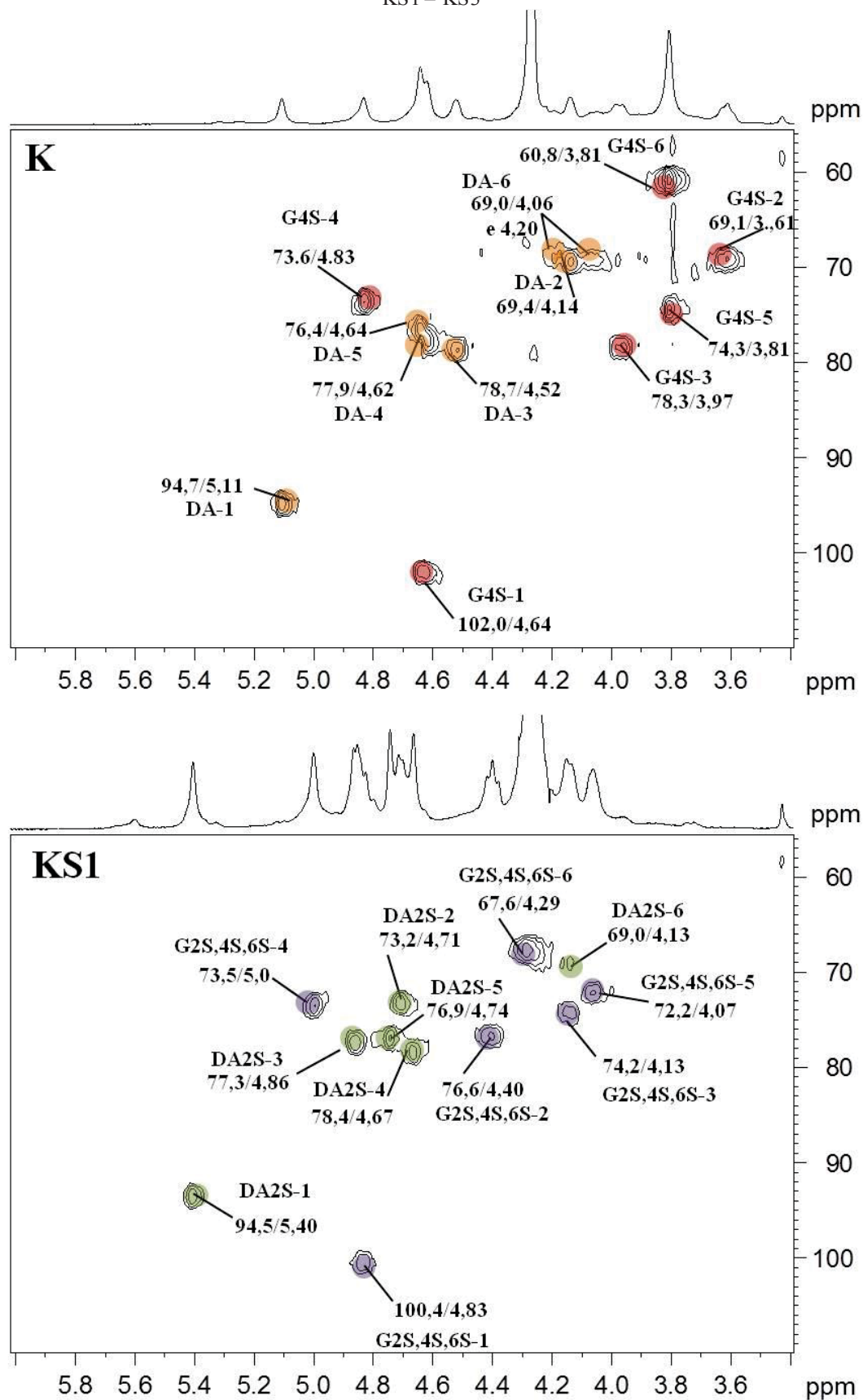
Já a sulfatação na posição C2/H2 das unidades 3,6-anidro- α -D-galactopirranose, ocasionou um deslocamento químico de 69,4/4,14 ppm para 73,2/4,71 ppm (efeito alfa de +3,8/+0,58 ppm), enquanto as correlações referentes a C1/H1 e C3/H3 foram observadas em 94,5/5,40 e 77,3/4,86 ppm, respectivamente, correspondentes à um efeito beta de -0,2/+0,29 e -1,4/+0,34 ppm, respectivamente (DE ARAÚJO et al., 2013; THÀNH et al., 2001; USOV, 1984; VAN DE VELDE; ROLLEMA, 2008).

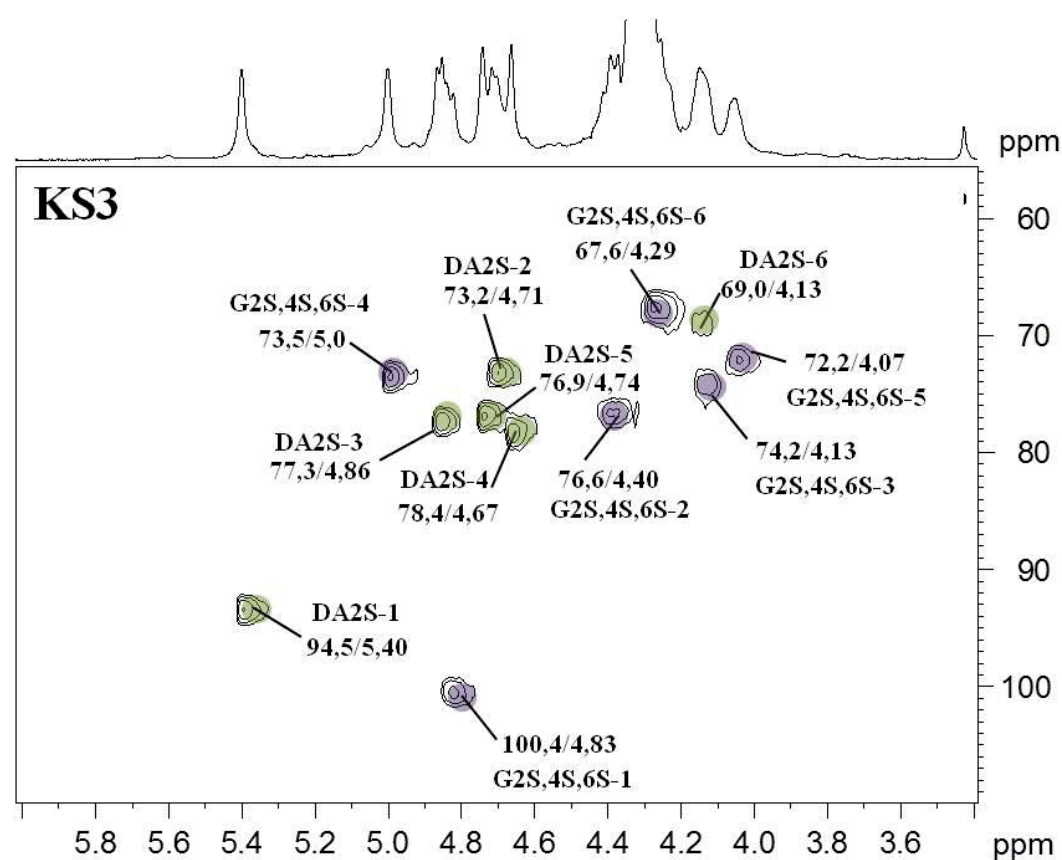
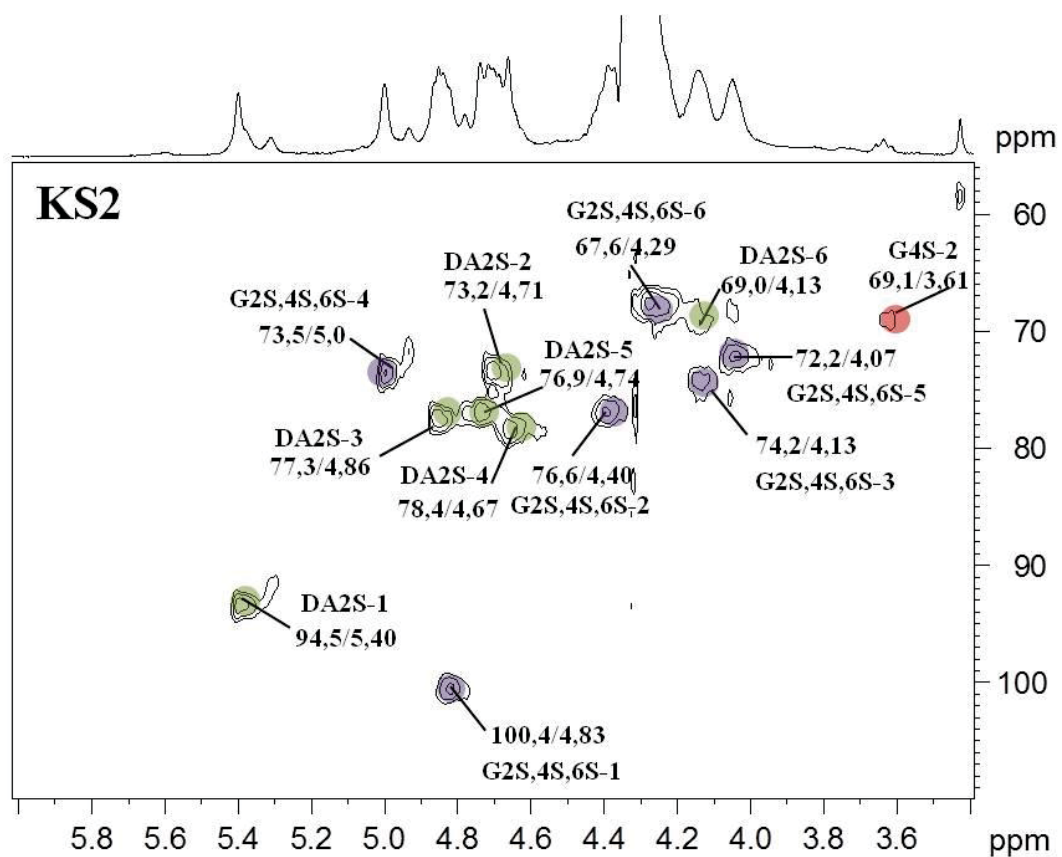
Destaca-se que a fração KS2, além das correlações referente a díade G2S,4S,6S – DA2S, ainda apresentava a correlação em 69,1/3,61 ppm correspondente os C2/H2 das unidades des β -D-galactopirranose-4-sulfato, indicando que esta fração não estava persulfatada, como as entradas KS1 e KS3 (DE ARAÚJO et al., 2013; THÀNH et al., 2001; USOV, 1984; VAN DE VELDE; ROLLEMA, 2008). Entretanto, todas as frações sulfatadas quimicamente (KS1 – KS3) apresentam as correlações referentes à díade $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp 2,4,6-trisulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-3,6-anidro-}\alpha\text{-D-Galp 2-sulfato-(1}\rightarrow]$. A TABELA 11 apresenta os assinalamentos dos ^1H e ^{13}C da díade G2S,4S,6S-DA2S.

Através das análises de RMN foi possível observar que a ausência do reagente 2-metil-2-butenol, não impede que a reação de sulfatação ocorra, já que as entradas KS2 e KS3 foram realizadas sem este reagente. Entretanto quando as entradas KS2 e KS3 foram realizadas em duas temperaturas diferentes, (30 °C e 60 °C) foi observado que na temperatura mais branda não houve a persulfatação do polissacarídeo (presença de unidades β -D-Galp não sulfatadas na posição C2), enquanto que na temperatura mais elevada, a *k*-carragenana foi persulfatada. Deste modo o reagente 2-metil-2-butenol não é necessário para que a reação de sulfatação da *k*-carragenana ocorra, pois a reação KS3 ocorreu eficientemente, mesmo sem sua presença.

As frações KS1 – KS3 foram analisadas através da cromatografia de HPSEC-MALLS-RI (FIGURA 41) e suas massas molares ponderais médias (M_w) foram estimadas pela curva padrão de galactanas.

FIGURA 40 – ESPECTROS DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO K E DAS FRAÇÕES PERSULFATADAS KS1 – KS3





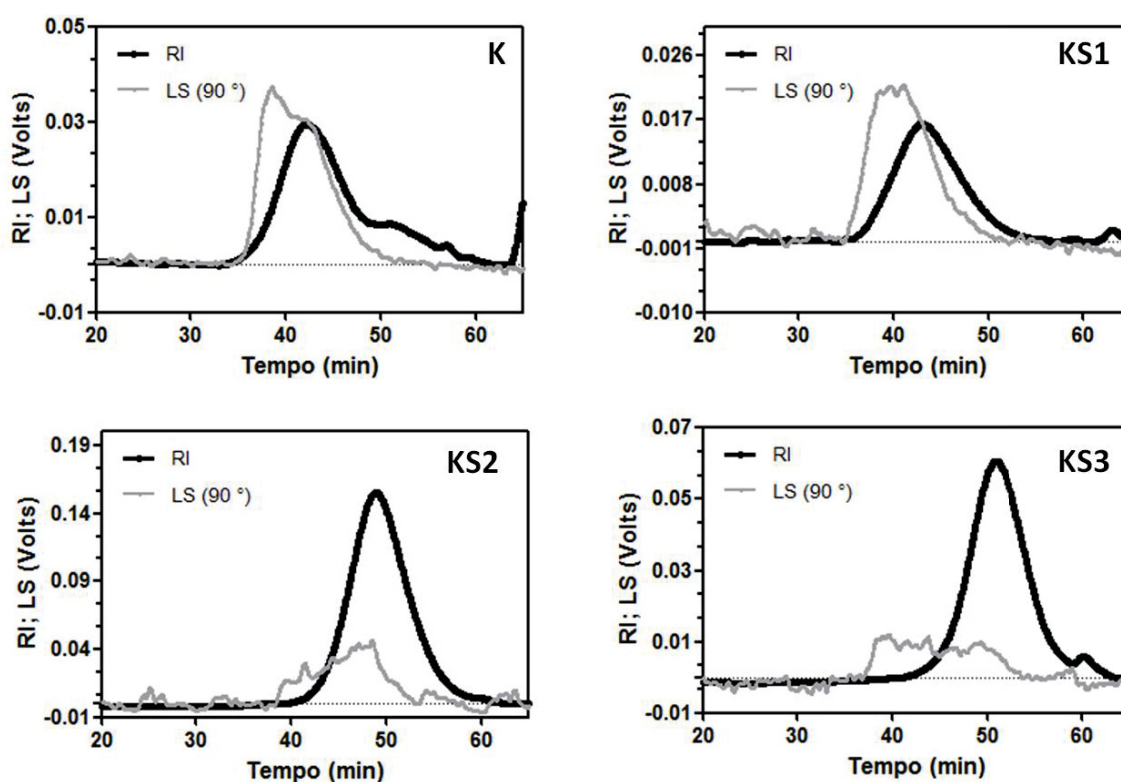
Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (30,2/2,224). Após a nomenclatura de KNUTSEN et al., (1994), o número refere-se à posição dos C/H da respectiva unidade. GS4 (●), DA (●), G2S,4S,6S (●) e DA2S (●) = unidades β-D-galactopiranoze 4-sulfato, 3,6-anidro-α-D-galactopiranoze, β-D-galactopiranoze 2,4,6-trisulfato e 3,6-anidro-α-D-galactopiranoze 2-sulfato, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

TABELA 11 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ KAPPA -CARRAGENANA PERSULFATADA

Unidade	C/H
G2S,4S,6S	1
	2
	3
	4
	5
	6
DA2S	1
	2
	3
	4
	5
	6

Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (30,2/2,224). Após a nomenclatura de KNUTSEN et al., (1994), o número refere-se à posição dos C/H da respectiva unidade. G2S,4S,6S e DA = unidades de β -D-galactopiranosse 2,4,6-trissulfato e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosse 2-sulfato, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 41 –HPSEC-MALLS-RI DAS FRAÇÕES K e KS1–KS3

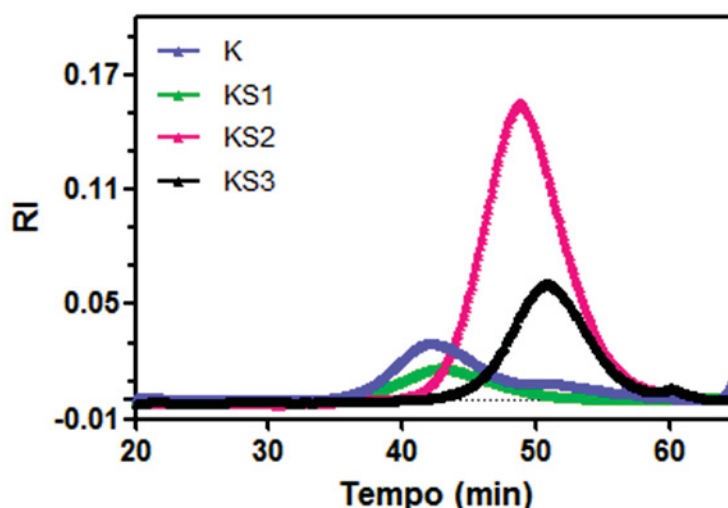


RI: refractive index; LS: Laser-light scattering. FONTE: O autor (2018).

Os perfis de eluição das frações sulfatadas quimicamente e nativa foram sobrepostos (FIGURA 42), demonstram que a fração K (42,2 min) é eluída quase que simultaneamente

com a fração KS1 (43,1 min), seguidas da fração KS2 (49,25 min) e da KS3 (50,8 min). As massas calculadas (TABELA 12)

FIGURA 42 – HPSEC DAS FRAÇÕES K e KS1–KS3



RI: *refractive index*.. FONTE: O autor (2018).

TABELA 12 – TEMPOS DE RETENÇÃO E MASSAS MOLARES PONDERAIS MÉDIAS (M_w) DA FRAÇÃO K E DAS FRAÇÕES QUIMICAMENTE SULFATADAS KS1 – KS3

Fração	Tr. ^a (min)	Mw. ^b (g.mol ⁻¹)
K	42,2	$1,5 \times 10^5$
KS1	43,1	$1,4 \times 10^5$
KS2	49,2	$9,5 \times 10^4$
KS3	50,8	$8,5 \times 10^4$

^{a,b} Tempo de retenção e massa molecular calculada através da curva padrão de galactanas sulfatadas. FONTE: O autor (2018).

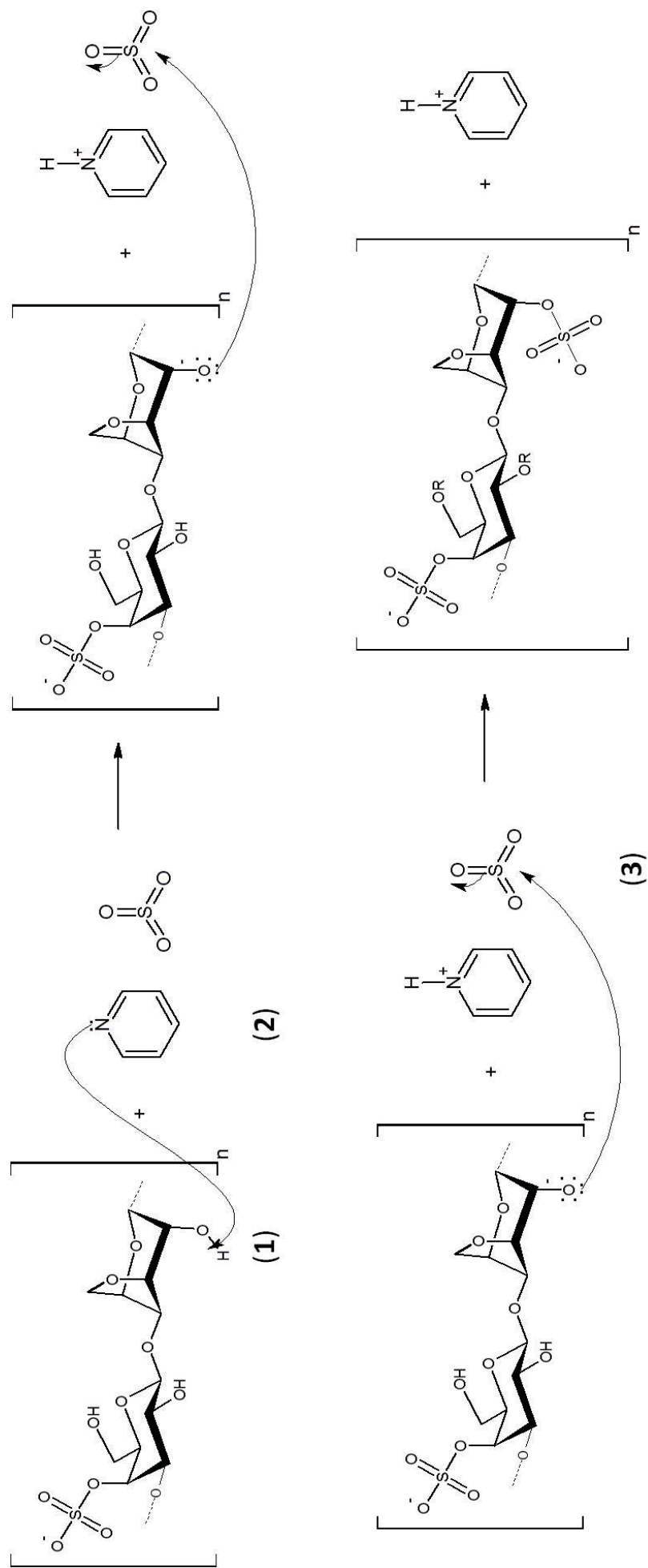
A fração nativa K e a quimicamente sulfatada KS1 apresentaram perfis de eluição similares, e a comparação das massas molares ponderais médias estimadas das frações K ($1,5 \times 10^5$ g. mol⁻¹) e KS1 ($1,4 \times 10^5$ g. mol⁻¹) se mostraram similares, apesar de ser esperado um incremento no Mw pela adição de grupos sulfato. Entretanto supõem-se que na fração KS1 ocorreu despolimerização, causada pelo rompimento das ligações glicosídicas mais lábeis (3,6-anidrogactose), devido ao meio reacional conter o complexo de trióxido de enxofre que apresenta caráter ácido.

Desta forma ocorreu um equilíbrio entre o ganho de massa devido ao grupo sulfato e a perda de massa causada pela despolimerização, resultando em 6,3% na diminuição da massa molar ponderal média. Este valor é baixo quando comparado a diminuição de 34,7% obtida por DE ARAÚJO e colaboradores (2013), para a *k*-carragenana nativa ($214.000 \text{ g.mol}^{-1}$) e persulfatada quimicamente ($74.300 \text{ g.mol}^{-1}$), indicando que o processo de sulfatação da fração KS1 foi eficiente tanto no processo incremento de grupos sulfato, como no baixo percentual de despolimerização da molécula.

Já quando correlacionadas as massas molares ponderais médias estimadas de KS1 ($1,4 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$), KS2 ($9,5 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$) e KS3 ($8,5 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$), ocorreu uma diminuição da massa de KS1 para KS2 de 1,5 vezes, provavelmente devido à ausência do reagente 2-metil-2-butenos durante a reação de sulfatação. Adicionalmente, quando comparados os Mw de KS1 e KS3 esta diminuição foi de aproximadamente 1,6 vezes, devido ao efeito sinérgico do aumento de temperatura em 30°C , e a ausência do reagente 2-metil-2-butenos. Na literatura é reportado que a sulfatação química de polissacarídeos geralmente promove a despolimerização parcial. PETIT e colaboradores (2004) sulfataram quimicamente um polissacarídeo contendo apenas unidades de ácido β -D-glucurônico 4-ligadas, reportando que mesmo aumentando o teor de grupos sulfato, as amostras foram parcialmente degradadas, apresentando uma massa molar ponderal média inferior a molécula precursora.

Esta etapa de otimização da reação de sulfatação evidenciou que o reagente 2-metil-2-butenos tem a função de minimizar a despolimerização do polissacarídeo durante a reação, além de não ser necessário para que a sulfatação ocorra, não atuando como inicializador da reação (catalizador). Apesar disto, foi verificado que a temperatura auxilia a reação de sulfatação, através da diminuição da viscosidade do meio reacional, facilitando desta forma o ataque nucleofílico ao complexo $\text{SO}_3\text{-Py}$.

Um mecanismo para reação de sulfatação da *kappa*-carragenana com o complexo $\text{SO}_3\text{-Py}$ foi proposto e demonstrado na FIGURA 43. A reação de sulfatação ocorre através de uma reação de adição nucleofílica ao enxofre. A reação é iniciada pela desprotonação da hidroxila do polissacarídeo (**1**) pela piridina (**2**), tornando o polissacarídeo um bom nucleófilo capaz de realizar o ataque nucleofílico ao enxofre (**3**), uma vez que os oxigênios (mais eletronegativo) do trióxido de enxofre puxam os elétrons para longe do enxofre (menos eletronegativo), tornando-se um bom eletrofilo.

FIGURA 43 – MECANISMO PROPOSTO DA REAÇÃO DE SULFATAÇÃO DA *KAPP4*-CARRA GENANA COM O COMPLEXO PIRIDINA-ENXOFRE

FONTE: O autor (2018)

No presente trabalho, a persulfatação da *kappa*-carragenana teve como intuito obter um polissacarídeo com diferente padrão de sulfatação, o qual foi posterior hidrolisado parcialmente, para obtenção de oligossacarídeos persulfatados. Desde modo, mesmo com menor massa molar ponderal média a entrada KS3 foi selecionada para a realização da reação preparativa de sulfatação, a qual tem a vantagem de não utilizar o reagente 2-metil-2-butenio, devido principalmente a sua alta toxicidade: em lactantes pode prejudicar as crianças em fase de amamentação; em pessoas em fase reprodutivas prejudicam a fertilidade além de causar a má formação dos bebês; em grávidas causam mutação genética nos fetos; além de causar tonturas e ser carcinogênico.

4.1.3 Semissíntese de KS-O

A fração K (9,6 g) foi utilizada para realizar a sulfatação química em escala preparativa. Entretanto uma única reação para esta grande quantidade de material, poderia gerar problemas, dentre eles a não repetibilidade do resultado obtido na etapa de otimização da reação devido ao aumento da escala reacional em quase 50 vezes.

Desta forma a fração K foi separada em três alíquotas (3,2 g)(7,8 mmols)(KS-O1 – KS-O3), e realizadas simultaneamente as reações de sulfatação conforme a entrada KS3. A fração K foi utilizada fracionada em alíquotas, apenas nas etapas de reação, neutralização e precipitação, pois para as etapas seguintes de tratamento (diálise e liofilização) as alíquotas foram reunidas em uma única fração.

A reação preparativa foi realizada como descrita anteriormente, utilizando o polissacarídeo na forma de sal de trietilamônio, com $\text{SO}_3\text{-Py}$ (20,3 mmols), em DMFa (350 mL) a 60 °C por 7 h. Em seguida as reações foram interrompidas com soluções de NaHCO_3 1 mol.L⁻¹ em banho de gelo até pH 7. Foram precipitadas com 3 volumes de etanol absoluto, centrifugadas, ressolubilizadas em água destilada. As frações KS-O1 – KS-O3 foram reunidas, dialisadas sequencialmente contra água destilada, cloreto de sódio 1 mol.L⁻¹ e água destilada (MWCO 6-8 KDa) e liofilizadas, gerando a fração KS-O (112,0% rendimento).

A fração KS-O obtida por sulfatação química da fração K foi analisada por RMN de ¹³C, ¹H e HSQC. Os espectros de KS-O apresentaram maior complexidade que os obtidos na reação de otimização KS3, apresentando maior número de sinais. Na FIGURA 44, está apresentado o espectro de RMN de ¹³C da fração nativa K e sulfatada KS-O. No espectro da fração K foram observados apenas dois sinais anoméricos: 102,0 e 94,7 ppm referentes as unidades de β-D-galactopiranoose 4-sulfato e 3,6-anidro-α-D-galactopiranoose,

respectivamente. A fração sulfatada quimicamente KS-O apresentou mais sinais anoméricos que a fração K, sendo os sinais de maior intensidade em 102,5 e 91,5 ppm. Estes sinais foram atribuídos aos carbonos anoméricos das unidades de β -D-galactopiranosose 4,6-disulfato e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato, respectivamente, constituindo a díade G4S,6S – DA2S (DE ARAÚJO et al., 2013; THÀNH et al., 2001).

Destaca-se, que no espectro da fração K é observado o sinal correspondente ao C6 não substituído (60,8 ppm) das unidades de β -D-Galp, enquanto que, no espectro da fração KS-O este sinal está ausente, apresentando os sinais de C6 sulfatado (67,8 – 66,6 ppm). Este resultado indica a total sulfatação em C6 das unidades de β -D-Galp (DE ARAÚJO et al., 2013; LIAO et al., 1996).

Na FIGURA 45 está apresentado o espectro de RMN de HSQC da fração KS-O. Na FIGURA 45 (A) as correlações em 100,4/4,84 e 93,4/5,38 foram atribuídas aos C/H anoméricos das unidades de β -D-galactopiranosose 2,4,6-trisulfato e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato, respectivamente, constituindo a díade G2S,4S,6S – DA2S (DE ARAÚJO et al., 2013; THÀNH et al., 2001). O espectro de RMN também apresentou correlações em 102,5/4,68 e 91,5/5,31 ppm atribuídas as unidades de β -D-galactopiranosose-4,6-disulfato e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose-2-sulfato, respectivamente (DE ARAÚJO et al., 2013; THÀNH et al., 2001; USOV, 1984), e em 102,2/4,66 e 94,7/5,10 ppm, correspondentes as unidades β -D-galactopiranosose-4,6-disulfato e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose, respectivamente (DE ARAÚJO et al., 2013; USOV, 1984). Estas unidades constituem as díades G4,6S – DA2S e G4,6S – DA, respectivamente.

Além destas díades descritas, foi possível identificar as correlações em 89,1/5,26 e 90,1/5,02 ppm atribuídas aos C/H das unidades redutoras de 3,6-anidro-D-galactose 2-sulfato (DA2S redutora) e 3,6-anidro-D-galactose (DA redutora), respectivamente (DUCATTI et al., 2011; STORTZ; CEREZO, 1991), demonstrado que houve despolimerização parcial durante a reação de sulfatação da fração K (PAPY-GARCIA et al., 2005).

Além disto não foi identificada a correlação referente ao C4 das unidades de β -D-Galp dessulfatas (67,4/4,15 ppm) (MILLER; WONG, NEWMAN, 1982). Este resultado indica que as unidades de β -D-Galp estão totalmente sulfatadas em C4.

Em resumo, a fração KS-O apresenta as unidades de β -D-Galp dissulfatadas em C4 e C6, as quais podem estar adicionalmente sulfatadas em C2. Estes resultados demonstram que a fração KS-O foi sulfatada quimicamente de maneira heterogênea e que houve despolimerização parcial das galactanas presente na fração KS-O durante este processo. Os assinalamentos das díades presentes na fração KS-O estão apresentados na TABELA 13.

Além disto, os sinais referentes as unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopirranose foram integradas no espectro de RMN de ^1H da fração KS-O (FIGURA 46), a fim de se estimar as porcentagem das díades presentes nesta fração. Entretanto o sinal em 5,02 ppm atribuído as unidades de 3,6-anidro-D-galactose redutora não foi utilizado no cálculo de porcentagem, uma vez que este próton está sobreposto com outras unidades, sendo desta forma desconsiderado pois poderia subestimar as unidades de DA redutora. Desta forma, a fração KS-O é composta por 47,3% de G2S,4S,6S – DA2S, 34,2% de G4S,6S – DA2S, 9,1% de G4S,6S – DA e 9,16% de unidades DA2S redutoras.

FIGURA 44 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS KS-O e K

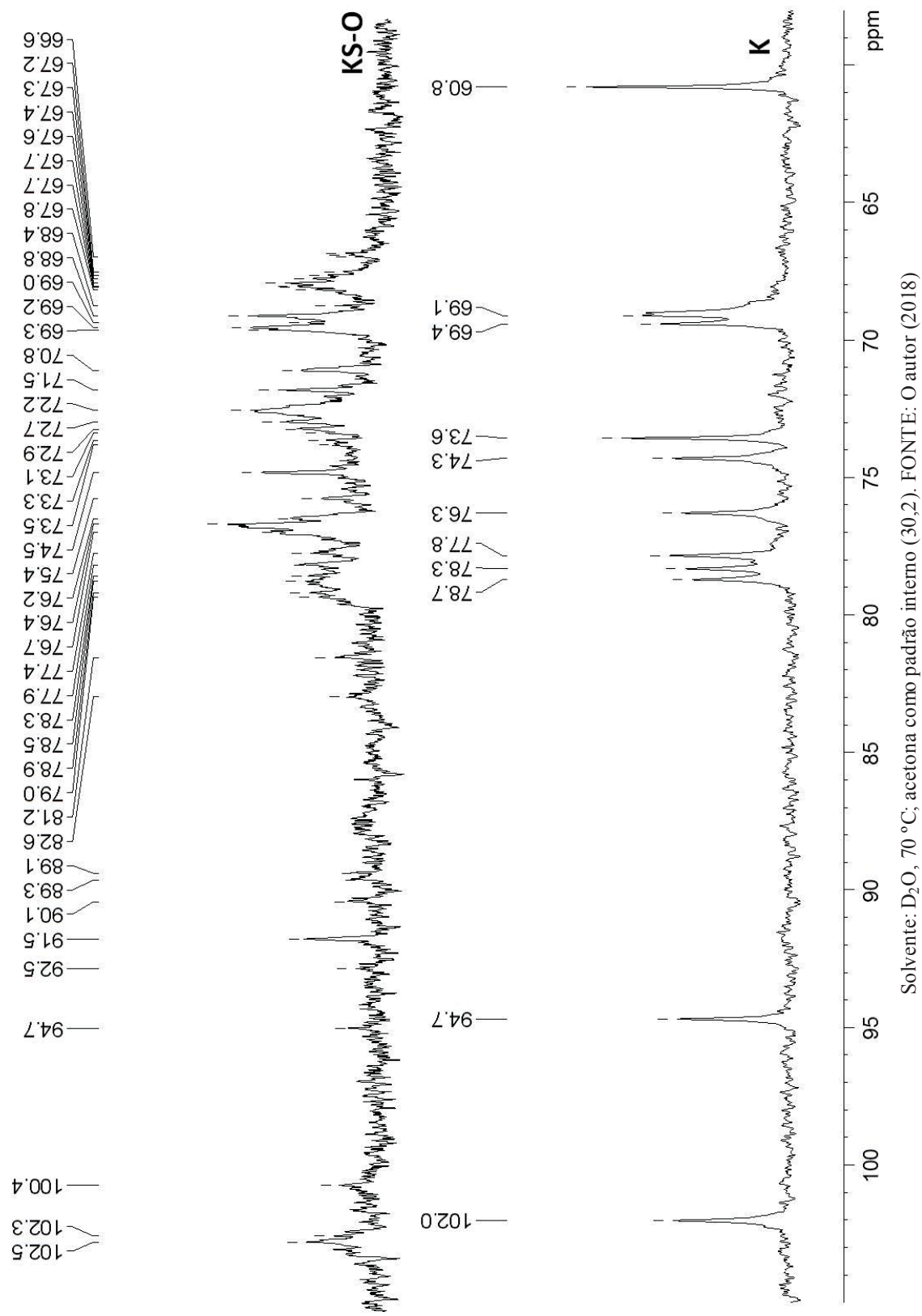
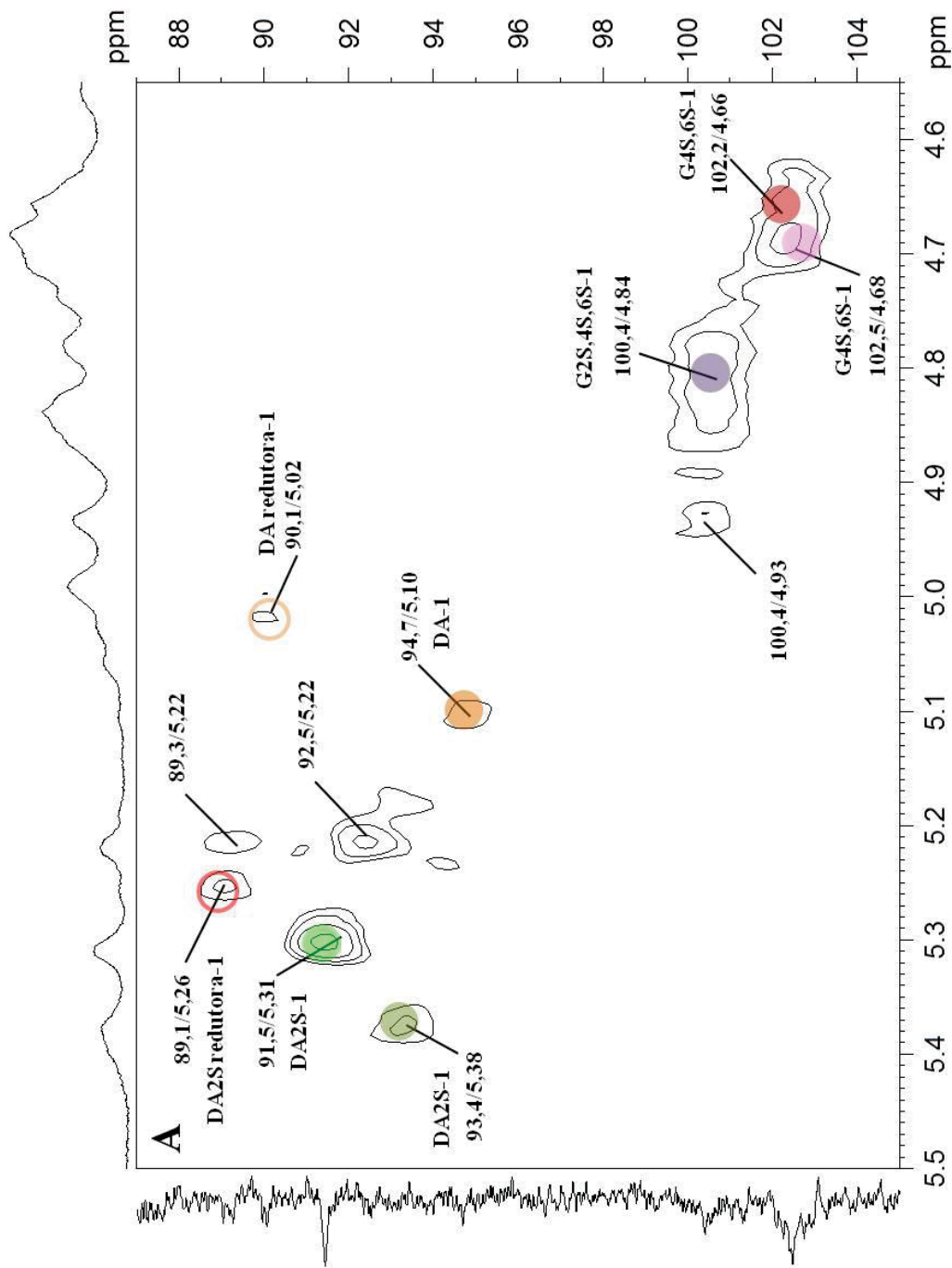
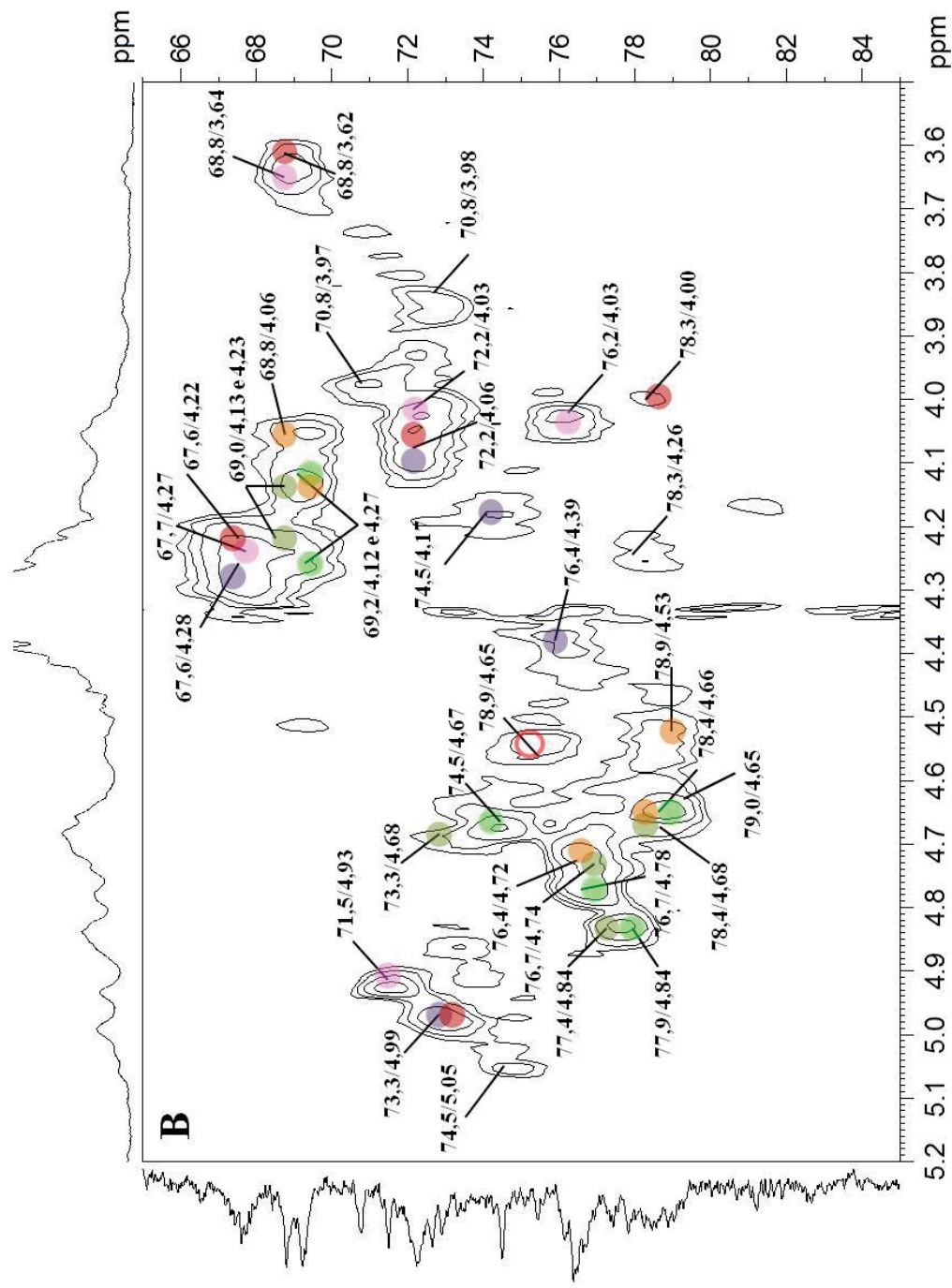


FIGURA 45 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA KS-O. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6)





Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (30,2/2,224). G2S, 4S, 6S (●), G4S, 6S (●), DA2S (●), DA2S redutor (●) e DA redutor (●) (KNUTSEN et al., 1994). FONTE: O autor (2018).

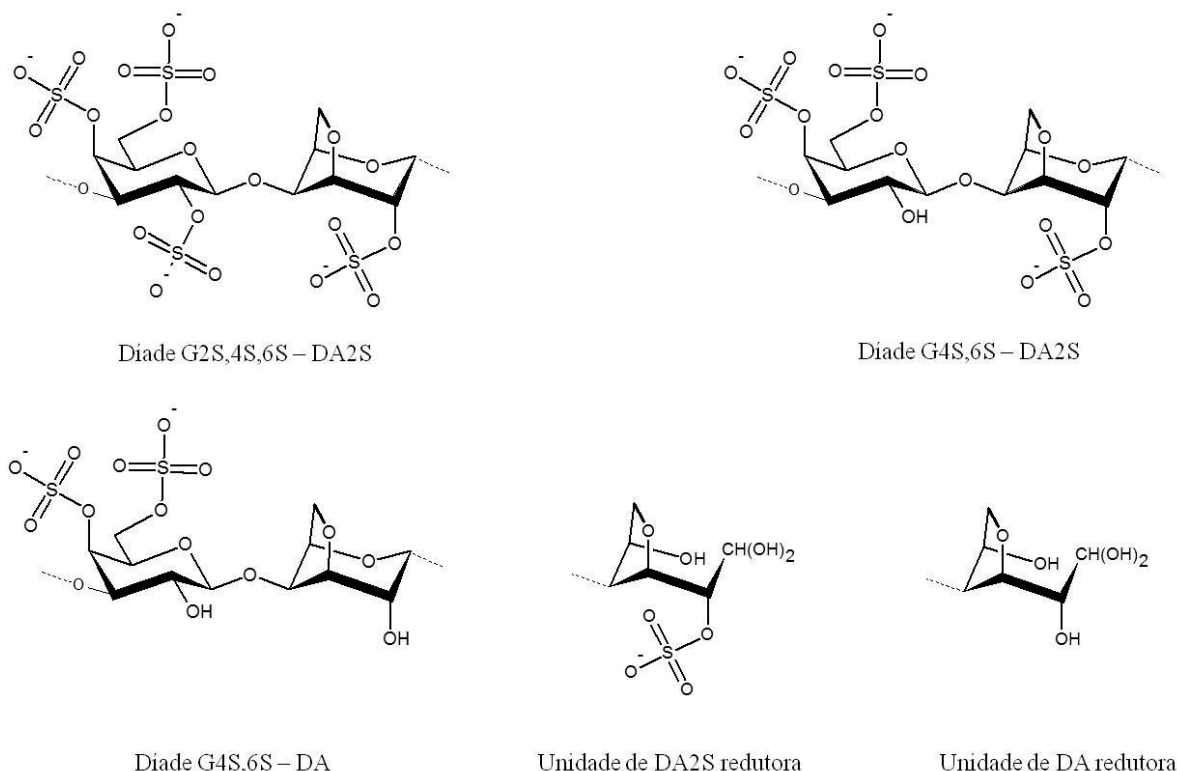
TABELA 13 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS DIÁDES CONSTITUINTES DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA KS-O

Díade	%	Unidade ^a	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
[\rightarrow 3)- β -D-Galp 2,4,6-trissulfato-(1 \rightarrow \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp 2-sulfato-(1 \rightarrow]	47,3	G2S,4S,6S	100,4/4,84	76,4/4,39	74,5/4,17	73,3/4,99	72,2/4,06	67,6/4,28
		DA2S	93,4/5,38	73,3/4,68.	77,4/4,84	78,4/4,68	76,7/4,74	69,0/4,14 e 4,23
[\rightarrow 3)- β -D-Galp 4,6-disulfato-(1 \rightarrow \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp 2-sulfato-(1 \rightarrow]	34,2	G4S,6S	102,5/4,68	68,8/3,64	76,2/4,03	71,5/4,93	72,7/4,03	67,7/4,27
		DA2S	91,5/5,31	74,5/4,67	77,9/4,84	79,0/4,65	76,7/4,78	69,2/4,12 e 4,27
[\rightarrow 3)- β -D-Galp 4,6-disulfato-(1 \rightarrow \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp ρ -(1 \rightarrow]	9,1	G4S,6S	102,2/4,66	68,6/3,62	78,3/4,00	73,3/4,99	72,2/4,03	67,6/4,22 e 4,27
		DA	94,7/5,10	69,3/4,12	78,9/4,53	78,4/4,66	76,4/4,72	68,8/4,06
[\rightarrow 4)-3,6-anidro-D-Gal 2-sulfato redutora	9,2	DA2S	89,1/5,26					
[\rightarrow 4)-3,6-anidro-D-Gal redutora	-	DA	90,1/5,02					

^a Códigos de letras referem-se à nomenclatura de KNUTSEN et al., 1994.

Na FIGURA 47 está a representação estrutural das quatro principais díades que compõem esta fração sulfatada KS-O.

FIGURA 47 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DAS PRINCIPAIS UNIDADES DISSACARÍDICAS E MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NA FRAÇÃO KS-O



FONTE: O autor (2018).

Foram determinados os teores de sulfato, enxofre e calculado o DS da fração KS-O, como demonstrado na TABELA 14.

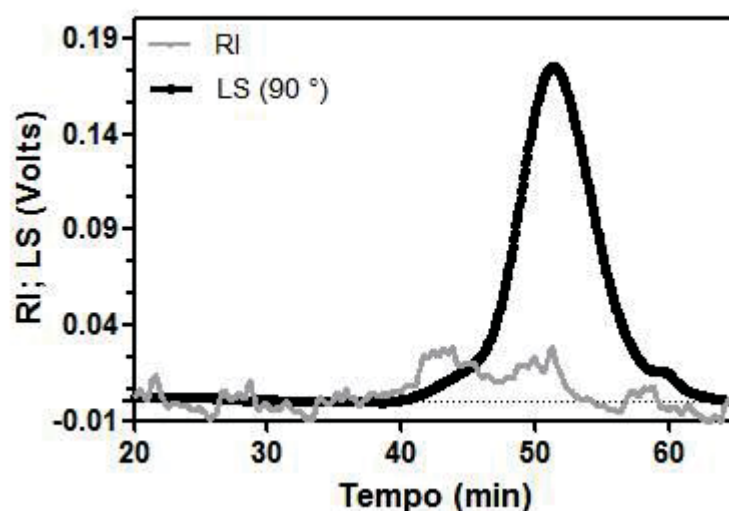
TABELA 14 – ANÁLISE DE SULFATO NA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA KS-O				
Fração	SO ₄ ^{-a} (%)	NaSO ₃ (%)	S (%)	DS ^b
K ^c	22,1	23,70	7,9	1,01
KS-O	48,2	51,71	17,24	3,66

^{a,b} determinações de acordo com os métodos de Dodgson (1961) e Whistler e Spencer (1964). ^c incluído para comparação.

A través do cálculo descrito por WHISTLER e SPENCER (1964), a fração KS-O apresentou um DS de 3,66, cujo aumento se deve principalmente pela sulfatação no carbono 6 da β -D-galactopirranose, visto que ele foi totalmente substituído pelo grupo sulfato, e pela sulfatação de C2 das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopirranose.

A fração KS-O foi analisada por cromatografia de HPSEC-MALLS-RI (FIGURA 48) sendo eluída em 50,42 min e sua massa molar ponderal média (M_w) estimada pela curva padrão de galactanas em $8,1 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$. Quando comparamos a massa molar ponderal média estimada da fração KS-O com a fração nativa K ($1,5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$), observou-se uma diminuição de 1,9 vezes, decorrente do processo de despolimerização devido ao efeito sinérgico da alta temperatura em meio ácido e da ausência do 2-metil-2-butenol.

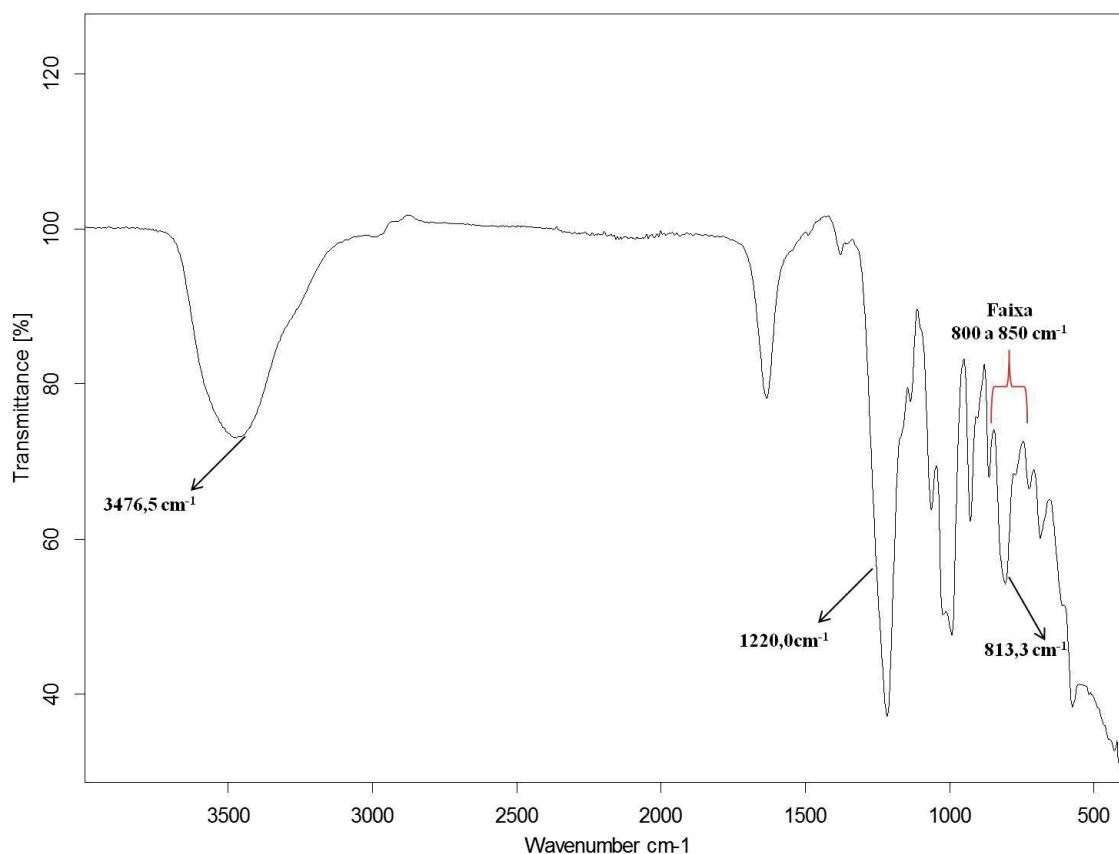
FIGURA 48 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO KS-O



RI: refractive index; LS: Laser-light scatterign. FONTE: O autor (2018).

O espectro de infravermelho da fração KS-O (FIGURA 49) apresentou um aumento da intensidade da banda na faixa de $800 - 840 \text{ cm}^{-1}$, quando comparado ao espectro da fração nativa K. Esta faixa corresponde aos estiramentos vibracionais característicos de grupos sulfatos nas unidades de β -D-galactopirranose, sendo em $850 - 840 \text{ cm}^{-1}$ (C4-S-O), $820 - 810 \text{ cm}^{-1}$ (C6-O-S), e $830 - 825 \text{ cm}^{-1}$ (C2-O-S). Adicionalmente, a faixa em $805 - 800 \text{ cm}^{-1}$ corresponde a presença de grupos O-sulfato no carbono 2 das unidades de 3,6-anidrogactose. Também foi observado um aumento da banda em $1220,0 \text{ cm}^{-1}$ (O=S=O estiramento vibracional assimétrico do grupo sulfato). Os aumentos de intensidade das bandas confirmam os resultados obtidos através das análises de RMN e da dosagem de sulfato, indicando que as unidades de 3,6-anidrogactose e β -D-gactose foram sulfatadas em C2 e em C2/C6, respectivamente, além do sulfato já presente em C4 das unidades de β -D-gactose. (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003; SEKRAL; LEGRAND, 1993).

FIGURA 49 – ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DA FRAÇÃO KS-O



Wavenumber: número de onda; Transmittance: transmitância. FONTE: O autor (2018).

A partir dos resultados aqui apresentados e discutidos, conclui-se que a fração KS-O obtida a partir da *k*-carragenana (fração K) corresponde a *k*-carragenana persulfatada, apresentando o grupo éster de sulfato principalmente nas posições C4 e C6 da unidade de β -D-galactopirranose e na unidade C2 da unidade de 3,6-anidro- α -D-galactopirranose. Destaca-se que, durante o processo de sulfatação ocorreu despolimerização do polissacarídeo, onde a fração KS-O apresentou uma menor Mw quando comparado a sua fração nativa. Entretanto esta redução da Mw não irá influenciar a produção dos derivados de menor massa (oligossacarídeos sulfatados).

4.1.4 Produção de oligossacarídeos redutores a partir das frações K e KS-O

Para produção de oligossacarídeos redutores a partir das frações K e KS-O, foram realizadas hidrólises parciais ácidas. As condições de hidrólises que fazem uso de TFA favorecem a quebra das ligações 3,6-anidro- α -galactosídica, além de conservarem o anel desta mesma unidade.

A metodologia para produção da carrabiose 4²-sulfato já foi descrita em nosso grupo

de pesquisa (DUCATTI et al., 2011). Entretanto a produção da carrabiose persulfatada nunca foi descrita na literatura.

Desta forma, foi realizada a hidrólise ácida parcial da fração K para produção da carrabiose 4²-sulfato, conforme metodologia de DUCATTI e colaboradores (2009), além da otimização da reação de hidrólise ácida parcial da fração KS-O, para obtenção de dissacarídeos que apresentem um maior teor de sulfato que a carrabiose 4²-sulfato, levando em consideração que o processo de hidrólise ácida parcial pode ocasionar hidrólise dos grupos sulfatos presentes na molécula (desulfatação).

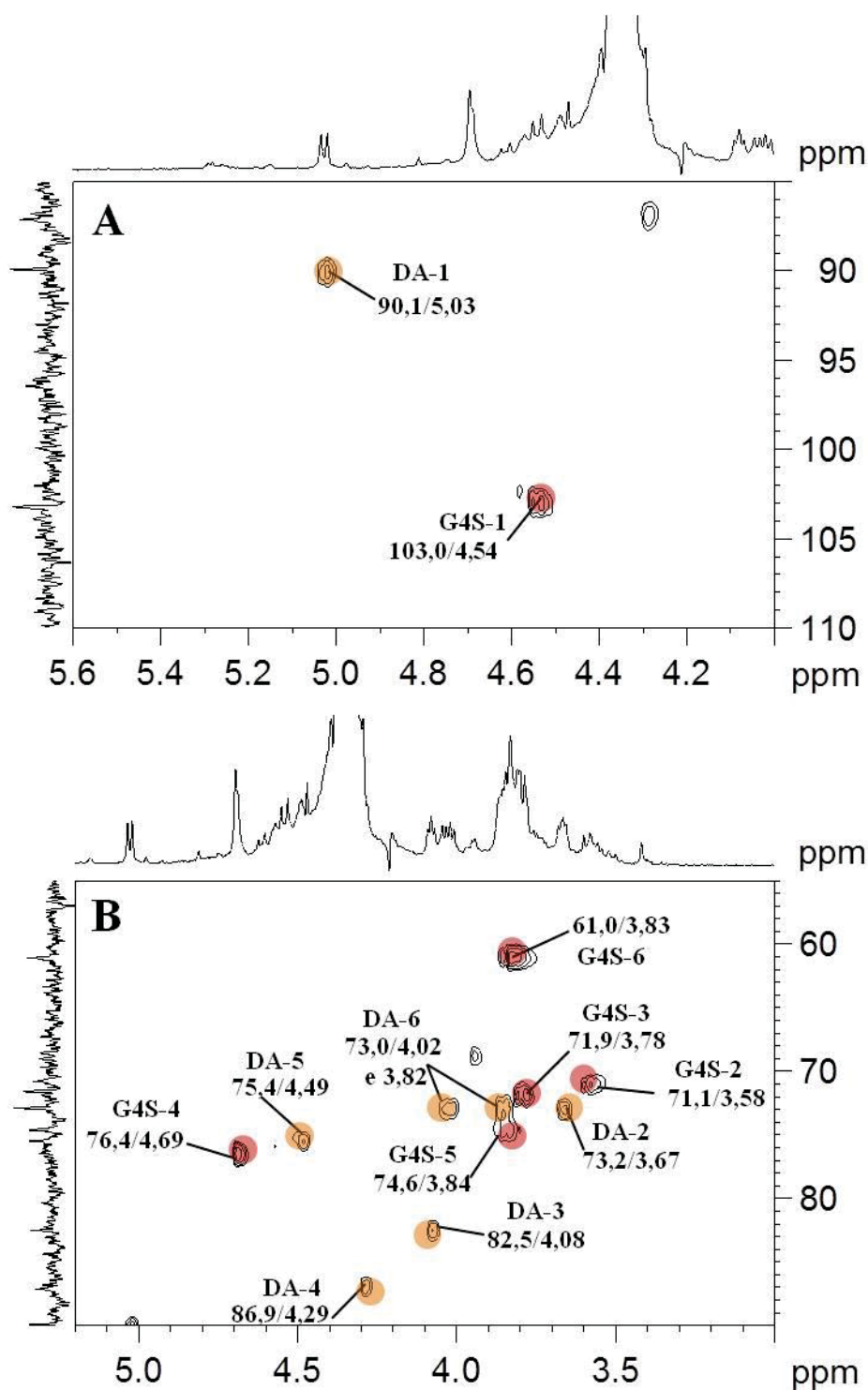
4.1.4.1 Hidrólise ácida parcial da fração K

O produto de hidrólise parcial ácida, da *kappa*-carragenana, foi obtido com um rendimento de recuperação de 90,3% (KD).

A fração KD foi analisada por RMN de ¹³C, ¹H e HSQC. O espectro de RMN de HSQC está apresentado na FIGURA 50. Na região anomérica (A) as correlações em 90,1/5,03 e 103,0/4,54 ppm foram atribuídas aos C1/H1 das unidades 3,6-anidro-D-galactose na forma redutora (diol geminal) e β-D-galactopiranosose 4-sulfato, respectivamente (DUCATTI et al., 2011).

Os sinais da FIGURA 50 (B), em 73,2/3,67, 82,5/4,08, 86,9/4,29, 75,4/4,49 e 73,0/4,02 e 3,82 ppm são referentes aos C2/H2, C3/H3, C4/H4, C5/H5 e C6/H6 das unidades de 3,6-anidro-D-galactose, respectivamente. Adicionalmente, as correlações 71,1/3,58, 71,9/3,78, 76,4/4,69, 74,6/3,84 e 61,0/3,83 ppm foram atribuídas aos C2/H2, C3/H3, C4/H4, C5/H5 e C6/H6 das unidades de β-D-galactopiranosose 4-sulfato, respectivamente. Estes assinalamentos estão de acordo com DUCATTI e colaboradores, 2011. Deste modo a fração KD é constituída majoritariamente de carrabiose 4²-sulfato redutora. A TABELA 15 apresenta os assinalamentos de RMN da fração dissacarídica KD, utilizando diferentes valores para o padrão interno adicionado (acetona).

FIGURA 50 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO DISSACARÍDICA KD. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6)



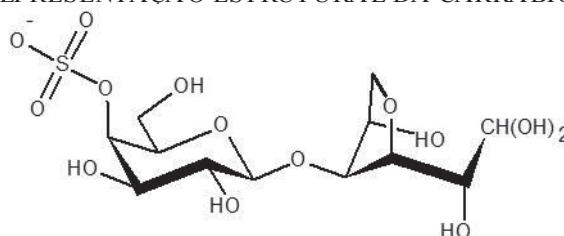
Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (30,2/2,224). Após a nomenclatura de KNUTSEN et al., 1994, o número refere-se à posição dos C/H da respectiva unidade. G4S e DA = unidades de β-D-galactopiranosose 4-sulfato e 3,6-anidro-α-D-galactopiranosose, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

TABELA 15 – ASSINALAMENTOS DOS $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DA CARRABIOSE 4²-SULFATO

Unidade		C/H ^a	C/H ^b
G4S	1	103,0/4,54	104,2/4,42
	2	71,1/3,58	72,3/3,45
	3	71,9/3,78	73,1/3,65
	4	76,4/4,69	77,6/4,57
	5	74,6/3,84	75,8/3,72
	6	61,0/3,83	62,2/3,71
DA red	1	90,1/5,03	92,2/4,91
	2	73,2/3,67	74,4/3,55
	3	82,5/4,08	83,7/3,95
	4	86,9/4,29	88,1/4,17
	5	75,4/4,49	76,6/4,37
	6	73,0/4,02 e 3,82	74,2/3,90 e 3,70

^{a,b} calibração do padrão interno em 30,2/2,224 e 31,45/2,10 ppm, respectivamente.

A FIGURA 51 representa a estrutura da carrabiose 4²-sulfato, constituinte da fração KD.

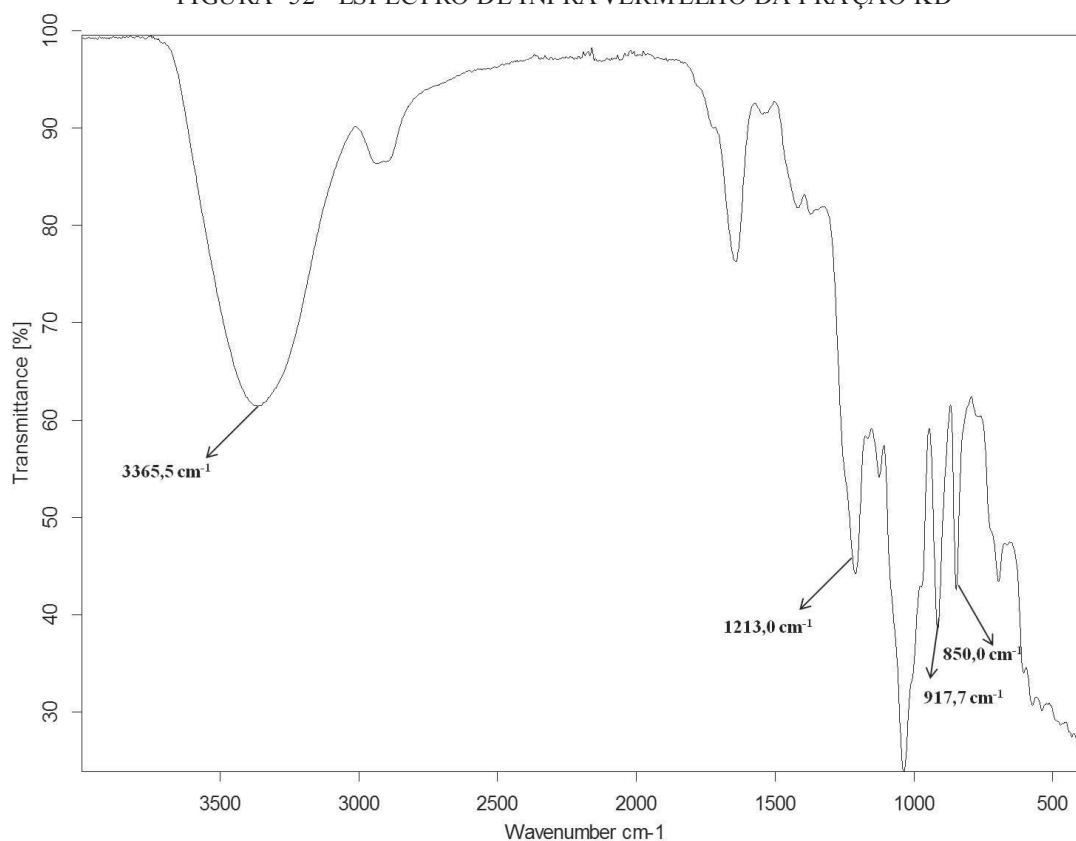
FIGURA 51 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA CARRABIOSE 4²-SULFATO

FONTE: O autor (2018).

A fração KD não foi analisada quando seu teor de sulfato e enxofre, pois a metodologia utilizada (Dodgson, 1961) não diferencia os grupos sulfatos livres e hidrolisados.

No espectro de infravermelho da fração KD (FIGURA 52) foram observadas bandas em 850,0 cm^{-1} (C4-O-S estiramento vibracional do grupo sulfato das unidades β -D-galactopirranose), 917,7 cm^{-1} (estiramento vibracional da ligação C-O-C das unidades de 3,6-anidrogactose), além da banda 1213,0 cm^{-1} (O=S=O estiramento vibracional assimétrico do grupo sulfato) (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003; SEKRAL; LEGRAND, 1993).

FIGURA 52 - ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DA FRAÇÃO KD



Wavenumber: número de onda; Transmittance: transmitância. FONTE: O autor (2018).

Os resultados obtidos demonstram que a fração KD é composta majoritariamente pela carrabiose 4²-sulfato, a qual foi obtida com o rendimento de recuperação de 90,3%. No presente trabalho a carrabiose 4²-sulfato redutora, foi utilizada na produção de polissacarídeos híbridos, a partir do poliurônideo alginato de sódio e seus produtos de hidrólise de menor massa molar denominados de blocos BM e blocos BG.

4.1.4.2 Hidrólise ácida parcial da fração KS-O

4.1.4.2.1 Curva de hidrólise ácida parcial da fração KS-O

Para determinar a condição de hidrólise que produz dissacarídeos sulfatados a partir da fração KS-O (1,2 g), foi realizado uma curva de hidrólise variando os tempos de reação. Todas as frações geradas (**Fr1** – **Fr7**) foram analisadas por RMN de ¹H e HSQC.

Na FIGURA 53, estão representados os espectros de RMN de HSQC das frações Fr1 – Fr7. A fração **Fr1**, apresentou sinais anoméricos em 91,6/5,30, 89,9/5,02 e 89,3/5,26 ppm, atribuídos à unidades 3,6-anidro- α -D-galactopirranose 2-sulfato, 3,6-anidro-D-galactose

reduzida e 3,6-anidro-D-galactose 2-sulfato reduzida, respectivamente (DE ARAÚJO et al., 2013; DUCATTI et al., 2011; STORTZ; CERREZO, 1991). Adicionalmente, o espectro de HSQC apresenta a correlação em 71,5/4,92 ppm atribuída ao C4/H4 unidades de β -D-galactopiranosose 4,6-disulfato ligadas a unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato (DE ARAÚJO et al., 2013; THÀNH et al., 2001). Portanto apesar de terem sido observadas as correlações anoméricas das unidades DA e DA2S nas formas redutoras, a presença das unidades DA2S 4-ligadas as unidades de G4S,6S 3-ligadas indicam que 30 min de hidrólise não foi suficiente para produzir somente dissacarídeos a partir da fração KS-O.

Diferentemente da fração **Fr1**, os espectros de RMN das frações **Fr2 – Fr7**, não apresentaram a correlação anomérica referente às unidades de DA2S (91,6/5,30 ppm), porém as correlações anoméricas atribuídas as unidades redutoras de DA e DA2S (89,9/5,02 e 89,3/5,26 ppm, respectivamente) foram observadas em todas as frações (STORTZ; CERREZO, 1991). De maneira semelhante nas frações Fr2 – Fr7 foram observadas apenas correlações referentes às unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato terminais não redutores (76,4/4,71 ppm) (DUCATTI et al., 2011).

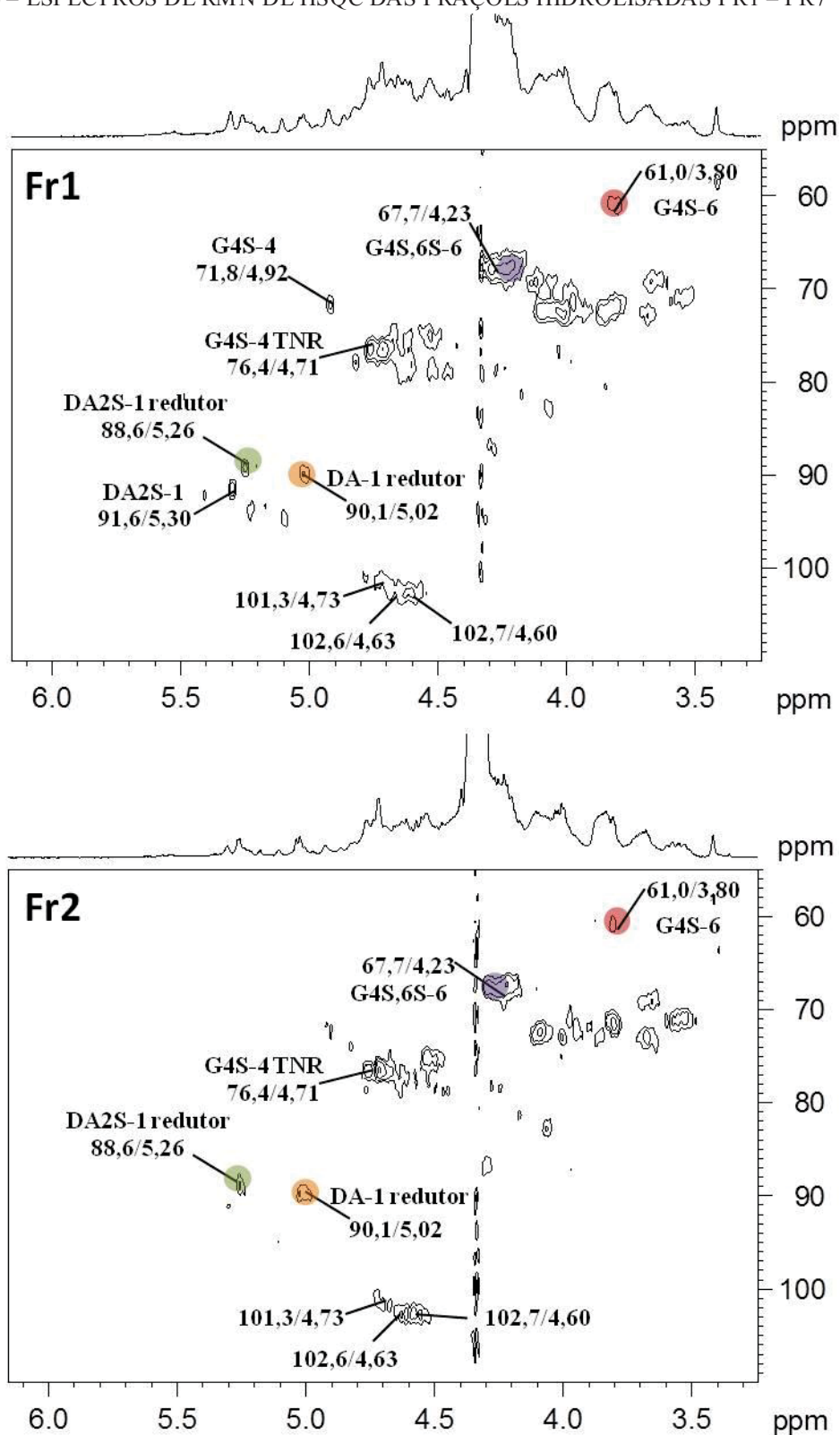
Destaca-se que os espectros de todas as frações apresentaram as correlações em 67,7/4,23 e 61,0/3,80 ppm atribuídas aos C6/H6 das unidades de β -D-galactopiranosose 4,6-disulfato e β -D-galactopiranosose 4-sulfato, respectivamente (CIANCIA et al., 1993; GONÇALVES, 2005; LIAO et al., 1996; THÀNH et al., 2001).

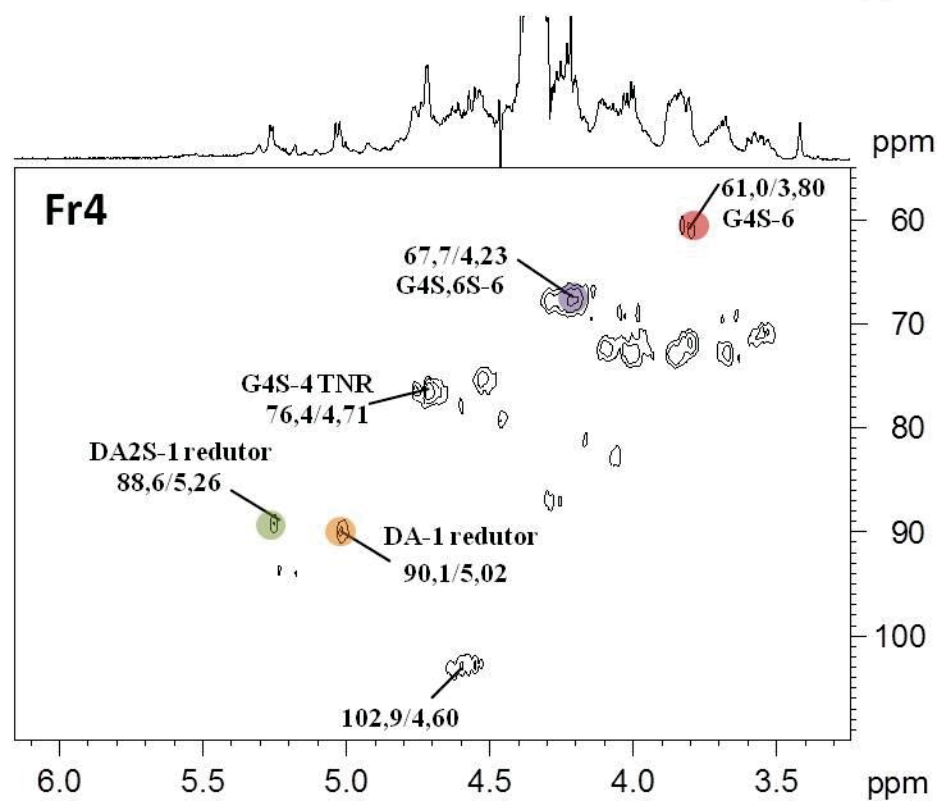
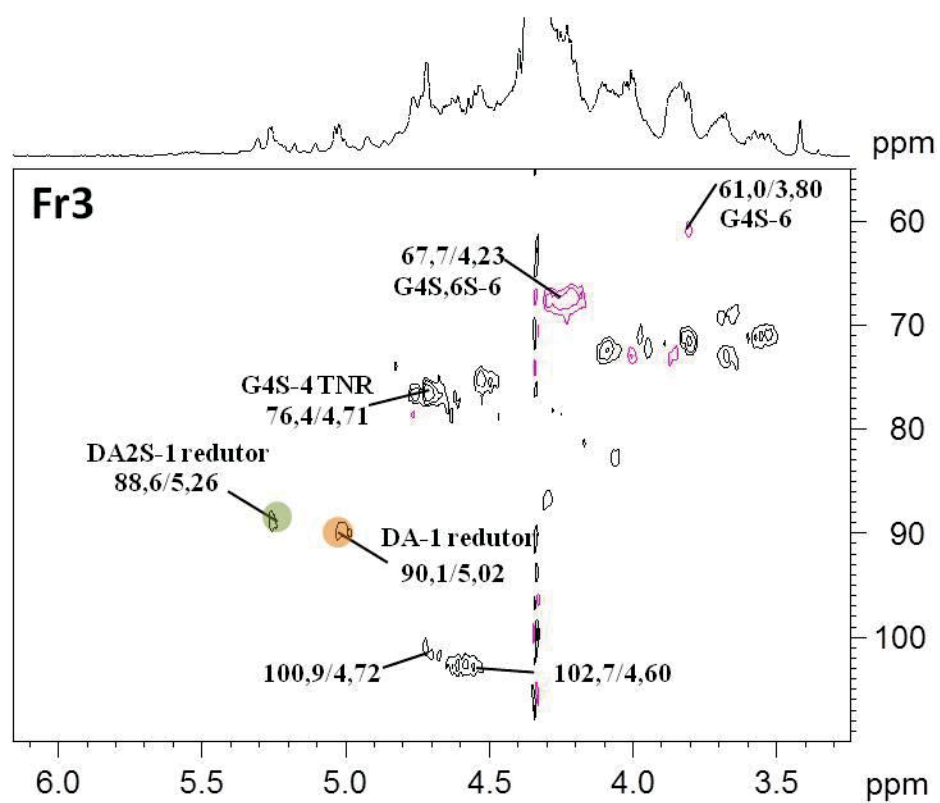
Desta forma, as frações Fr2 – Fr7 são constituídas principalmente por misturas de dissacarídeos sulfatados, podendo ser constituídas por díades de G4S – DA redutora, G4S – DA2S redutora, G4,6S – DA redutora e G4,6S – DA2S redutora.

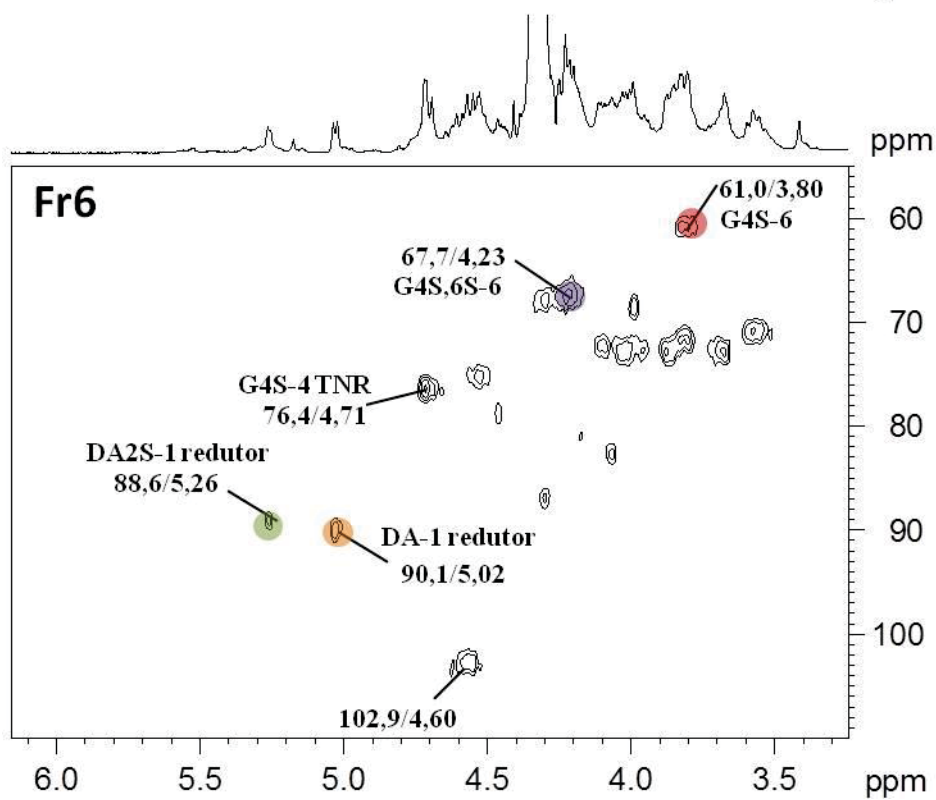
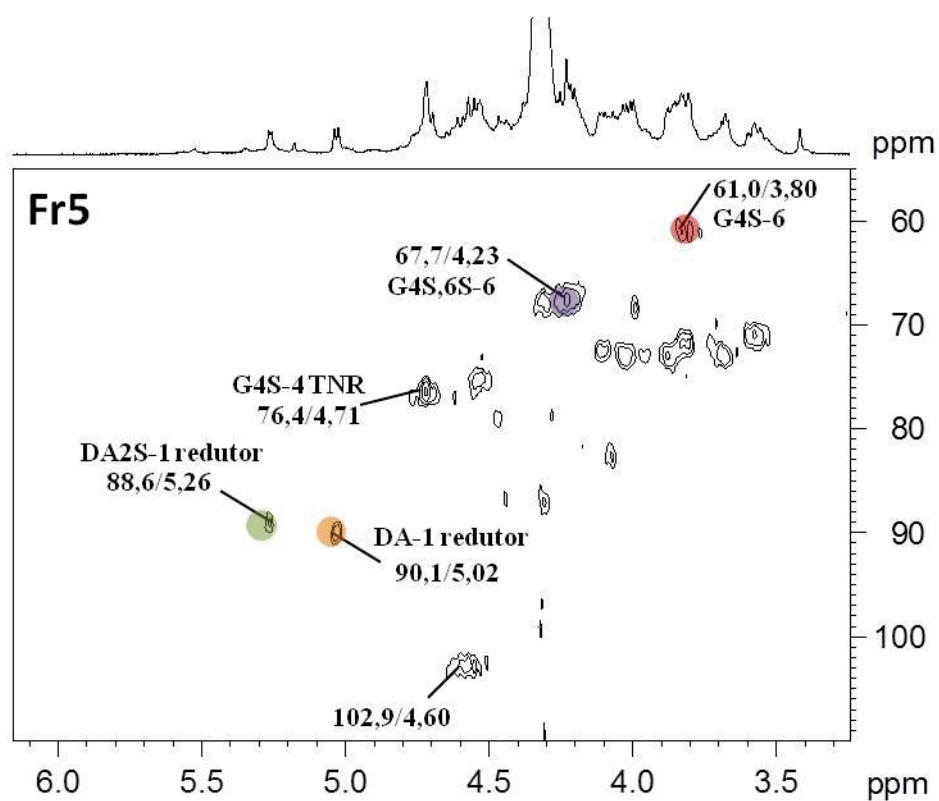
Através da integração dos sinais 5,02 e 5,26 ppm nos espectros de RMN ^1H das frações Fr1 – Fr7 (FIGURA 54), foi possível estimar os percentuais das unidades DA redutora e DA2S redutora presentes nas frações hidrolisadas (TABELA 16). Após 30 minutos (Fr1) de hidrólise, estavam presentes 57,3% de unidades DA2S redutoras e 42,7% de DA redutoras, enquanto que, a partir de 45 min (Fr2 – Fr7), menos de 50% das unidades de DA2S redutoras estavam presentes, mostrando a labilidade do grupo sulfato em carbono-2 das unidades de 3,6-anidro-D-galactose

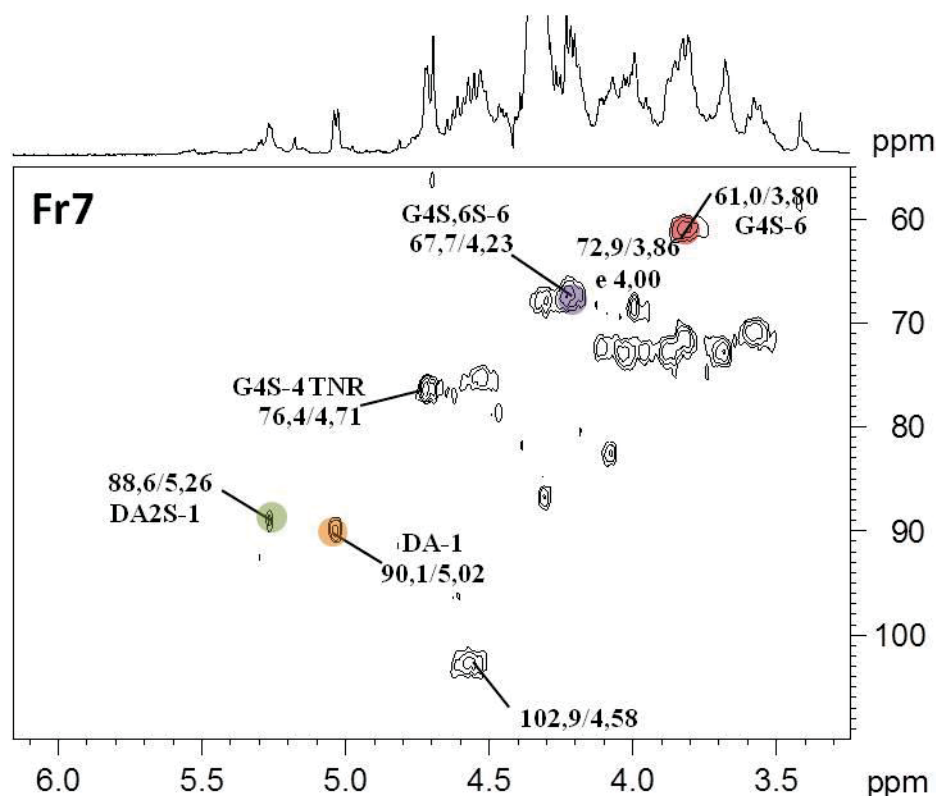
Além disto, foram realizadas integrações das correlações em 67,7/4,23 e 61,0/3,80 ppm nos espectros de RMN de HSQC (não demonstrado), permitindo estimar os percentuais de unidades de G4S e G4,6S, respectivamente (TABELA 16). As unidades de β -D-galactopiranosose apresentaram um alto percentual de sulfatação no carbono-6, pois após 30 min de hidrólise 92,3% de unidades estavam sulfatadas em C6, e mesmo após 240 min de

FIGURA 53 – ESPECTROS DE RMN DE HSQC DAS FRAÇÕES HIDROLISADAS FR1 – FR7







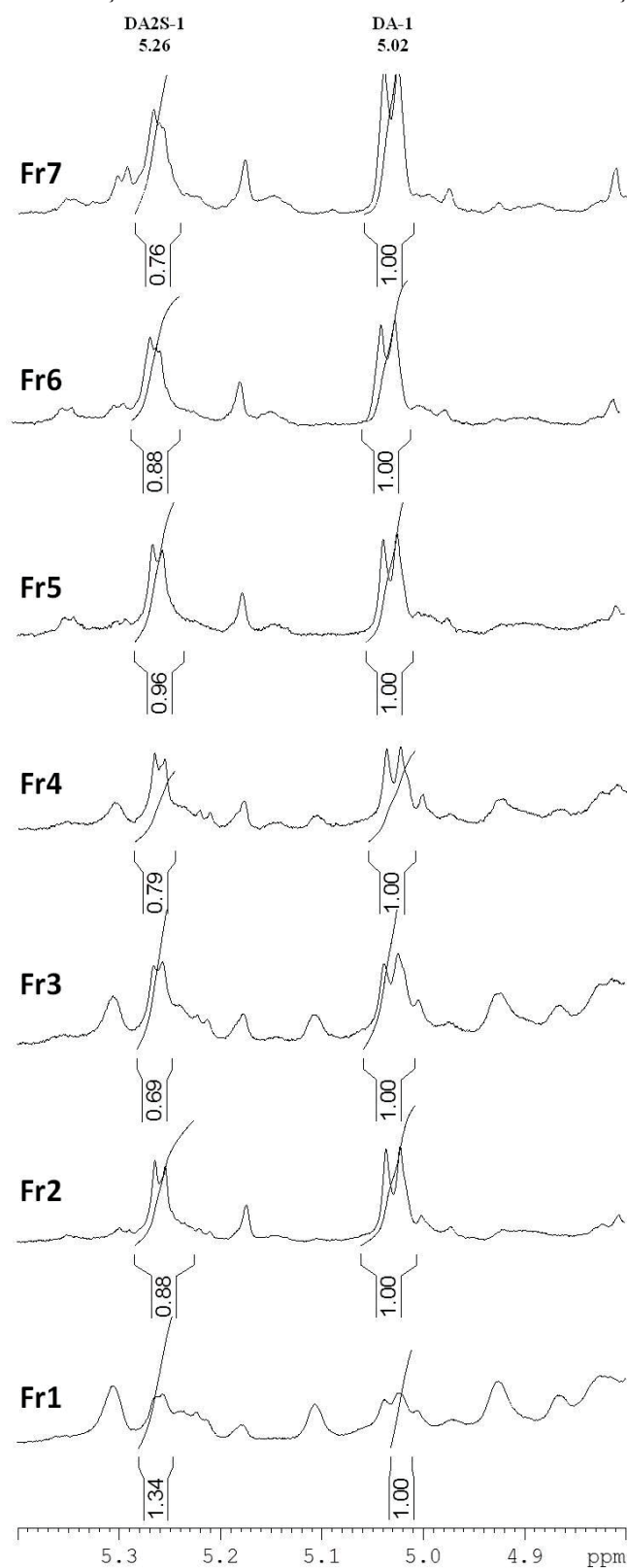


Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (30,2/2,224). Após a nomenclatura de KNUTSEN et al., 1994, o número refere-se à posição dos C/H da respectiva unidade. G4S-6 (●), DA-1 redutor (●), G4S,6S-6 (●) e DA2S-1 redutor (●) = unidades β-D-galactopiranoose 4-sulfato, 3,6-anidro-α-D-galactopiranoose redutora, β-D-galactopiranoose 4,6-disulfato e 3,6-anidro-α-D-galactopiranoose 2-sulfato redutora, respectivamente. TNR: Terminal não redutor. FONTE: O autor (2018).

hidrólise, mais de 60% desta posição C6 continuava sulfatado.

A dessulfatação em C2/C6 e C2 das unidades de β-D-galactopiranoose e 3,6-anidro-α-D-galactopiranoose, respectivamente, é reportada na literatura. GONÇALVES (2005) observou a dessulfatação em C2 das unidades de β-D-galactopiranoose ao produzir por hidrólise redutiva parcial o carrabitol 2-sulfato a partir da *theta*-carragenana, obtendo o dissacarídeo sulfatado na posição C2 da unidade de 3,6-anidrogactitol e dessulfatado em C2 da unidade de β-D-galactopiranoose. Além disto, NOSEDA e CERREZO (1993), já haviam reportado uma maior tendência de hidrólise dos grupos sulfatos na posição C2 destas unidades, quando comparada a outras posições na *lambda*-carragenana e *theta*-carragenanas.

Desta forma, pode-se concluir que os grupos sulfatos apresentam diferentes labilidades, sendo dependentes da posição no anel piranosídico ao qual estão ligados. O grupo sulfato quando está presente no carbono-2 torna-se mais lábil do que no carbono-6 das unidades de β-D-galactopiranoose nas condições hidrolíticas usadas no presente trabalho.

FIGURA 54 – INTEGRAÇÕES DOS SINAIS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES FR1 – FR7

Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (2,224). DA2S-1 e DA-1 representam os hidrogênios anoméricos das unidades e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosse 2-sulfato e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosse, respectivamente.

TABELA 16 – PORCENTAGENS DE UNIDADES SULFATADAS NAS FRAÇÕES FR1 – FR7

Fração	DA redutora (%)	DA2S redutora (%)	G4S (%)	G4,6S^a (%)
Fr1	42,7	57,3	7,7	92,3
Fr2	53,2	46,8	16,6	83,4
Fr3	59,2	40,8	5,8	94,2
Fr4	55,9	44,1	13,7	86,3
Fr5	59,0	49,0	17,5	82,5
Fr6	53,2	46,8	22,4	77,6
Fr7	56,9	43,1	35,7	64,3

^a Percentagem referente a sulfatação em C6 das unidades de G4S,6S. FONTE: O autor (2018).

A condição hidrolítica da fração Fr2 apresentou um alto percentual de unidades DA2S e G4S,6S sulfatadas no carbono-2 (46,8%) e no carbono-6 (83,4%), respectivamente. Desta forma o tempo de hidrólise de 45 min foi selecionado para realizar em escala preparativa a produção de oligossacarídeos, a partir da fração KS-O.

4.1.4.2.2 Semissíntese de KD-OS

A fração polissacarídica KS-O (8,4 g) foi utilizada para reação de hidrólise ácida parcial em escala preparativa. A produção de oligossacarídeos sulfatados foi realizada conforme a condição reacional da fração Fr2 (descrita no item anterior), gerando a fração KD-OS (89,3% rendimento).

A fração KD-OS foi analisada por RMN de ^{13}C , ^{13}C -Dept, ^1H e HSQC. Na FIGURA 55, está apresentado o espectro ampliado de RMN de ^{13}C -Dept e ^{13}C da fração hidrolisada, KD-OS. O sinal Dept invertido em 60,8 ppm foi atribuído ao C6 das unidades de β -D-galactopirranose desulfatadas, enquanto os sinais em 67,5, 67,7, 67,8 e 67,9 ppm foram atribuídos aos C6 das unidades de β -D-galactopirranose 6-sulfato (DUCATTI et al., 2011; KOLENDER; MATULEWICZ, 2004; LIAO et al., 1996; STORTZ; CEREZO, 1991; USOV, 1984).

O espectro de RMN de HSQC da fração KD-OS está representado na FIGURA 56 **A**, **B**. O espectro de RMN de KD-OS na FIGURA 56 (**B**) mostrou que as unidades de β -D-galactopirranose são todas sulfatadas em C4 (C4/H4 em 76,6/4,77 ppm) (DUCATTI et al., 2011; STORTZ; CEREZO, 1991), pois os deslocamentos químicos de C4/H4 não sulfato (66,7/4,14 ppm) estão ausentes no espectro (USOV, 1984; VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004).

Na FIGURA 56 (A), foram observadas as correlações em 89,0/5,26 e 89,9/5,03 ppm, as quais foram atribuídas aos C1/H1 das unidades redutoras de 3,6-anidro-D-galactose 2-sulfato e 3,6-anidro- α -D-galactose, respectivamente (DUCATTI et al., 2011; STORTZ; CEREZO, 1991). Enquanto na FIGURA B, as correlações em 82,6/4,08 e 87,2/4,29 ppm foram atribuídas aos C3/H3 e C4/H4 das unidades de 3,6-anidro-D-galactose redutoras (DUCATTI et al., 2011; STORTZ; CEREZO, 1991).

Adicionalmente, as correlações em 91,7/5,31 e 93,6/5,24 ppm foram atribuídas aos C1/H1 das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactose 2 sulfato (GONÇALVES et al., 2005; THÀNH et al., 2001; VAN DE VELDE et al., 2002). Também foi observado a correlação em 94,7/5,11 ppm atribuída ao C1/H1 das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactose (THÀNH et al., 2001; VAN DE VELDE et al., 2002).

O espectro de RMN de HSQC apresentou ainda as correlações em 102,9/4,65 e 102,6/4,63 ppm, as quais foram atribuídas a unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato e/ou β -D-galactopiranosose 4,6-disulfato. (DE ARAÚJO et al., 2013; LIAO et al., 1996; THÀNH et al., 2001; USOV, 1984).

Através da integração dos sinais (não mostrado) de C6 das unidades de β -D-galactopiranosose 6-sulfato (67,7/4,29, 67,8/4,22 ppm) e β -D-galactopiranosose (60,3/81 ppm) no espectro de RMN de HSQC, foi possível estimar que 85,5% das díades presentes na fração KD-OS são constituídas por unidades de β -D-galactopiranosose 4,6-disulfato, e 14,5% são constituídas por unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato.

Adicionalmente, foram realizadas integrações no espectro de RMN de ^1H da fração KD-OS (FIGURA 57). Os sinais anoméricos referentes as unidades de 3,6-anidro-D-galactose (5,03, 5,11, 5,24, 5,26, 5,31 e 5,38 ppm) foram integradas a fim de se estimar o tamanho do oligossacarídeo, além da relação de unidades sulfatadas e dessulfatadas em C2 das unidades de 3,6-anidro-D-galactose. Entretanto, apesar do sinal em 87,6/5,38 ppm não ter sido atribuído a nenhuma unidade, supõem-se e considerou-se que o mesmo, seja referente a unidades redutoras de 3,6-anidro-D-galactose 2-sulfato internas. Desta forma, através da integração das áreas determinou-se que aproximadamente 50,8% das unidades de 3,6-anidro-D-galactose presentes na fração KD-OS são terminais redutores, enquanto 49,5 são unidades internas. Além disto, também foi determinado que 66,2% das unidades de 3,6-anidro-D-galactose estão sulfatadas em C2, e 33,8% dessulfatadas.

Desta forma, a fração KD-OS é composta por uma mistura de oligossacarídeos, a qual apresentam um teor de grupos sulfato maior que a fração dissacarídica KD, devido

principalmente a presença de ésteres de sulfato em C6 e C2 das unidades de β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro-D-galactose, respectivamente

A FIGURA 58 apresenta o espectro de infravermelho da fração KD-OS, sendo observado bandas características do estiramento vibracional do grupo sulfato em unidades de β -D-galactopiranosose, em $850,9\text{ cm}^{-1}$ (C4-O-S) e $820,3\text{ cm}^{-1}$ (C6-O-S), além da banda em $1206,2\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento vibracional assimétrico do grupo sulfato $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003; SEKRAL; LEGRAND, 1993).

Através desta análise confirmou-se a presença de unidades sulfatadas na posição 6 da β -D-galactopiranosose, como demonstrado pela análise de RMN de HSQC, indicando que mesmo após o processo hidrolítico ácido é possível observar e identificar grupos ésteres de sulfato em C4 e C6, principalmente nas unidades de β -D-galactopiranosose.

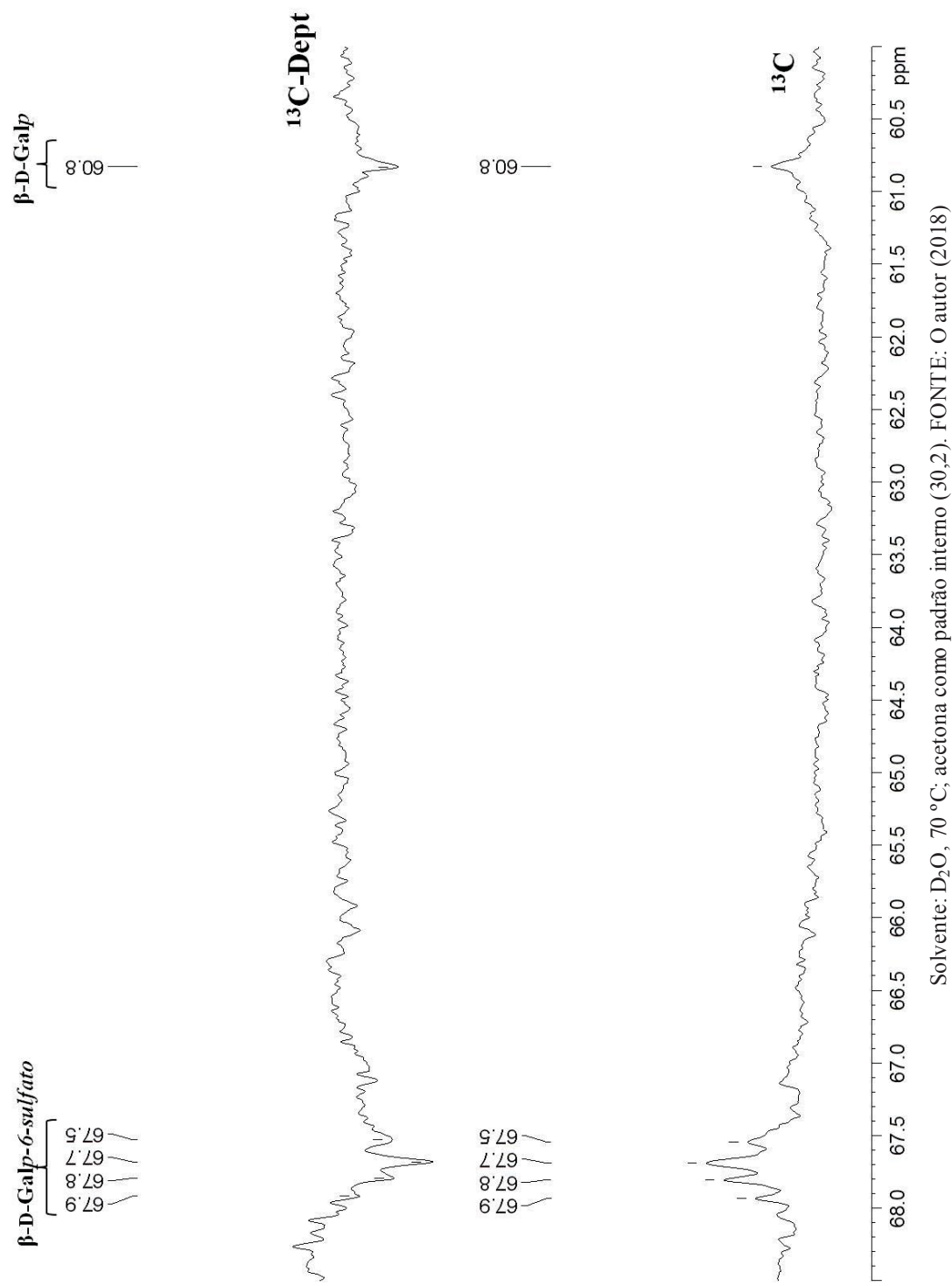
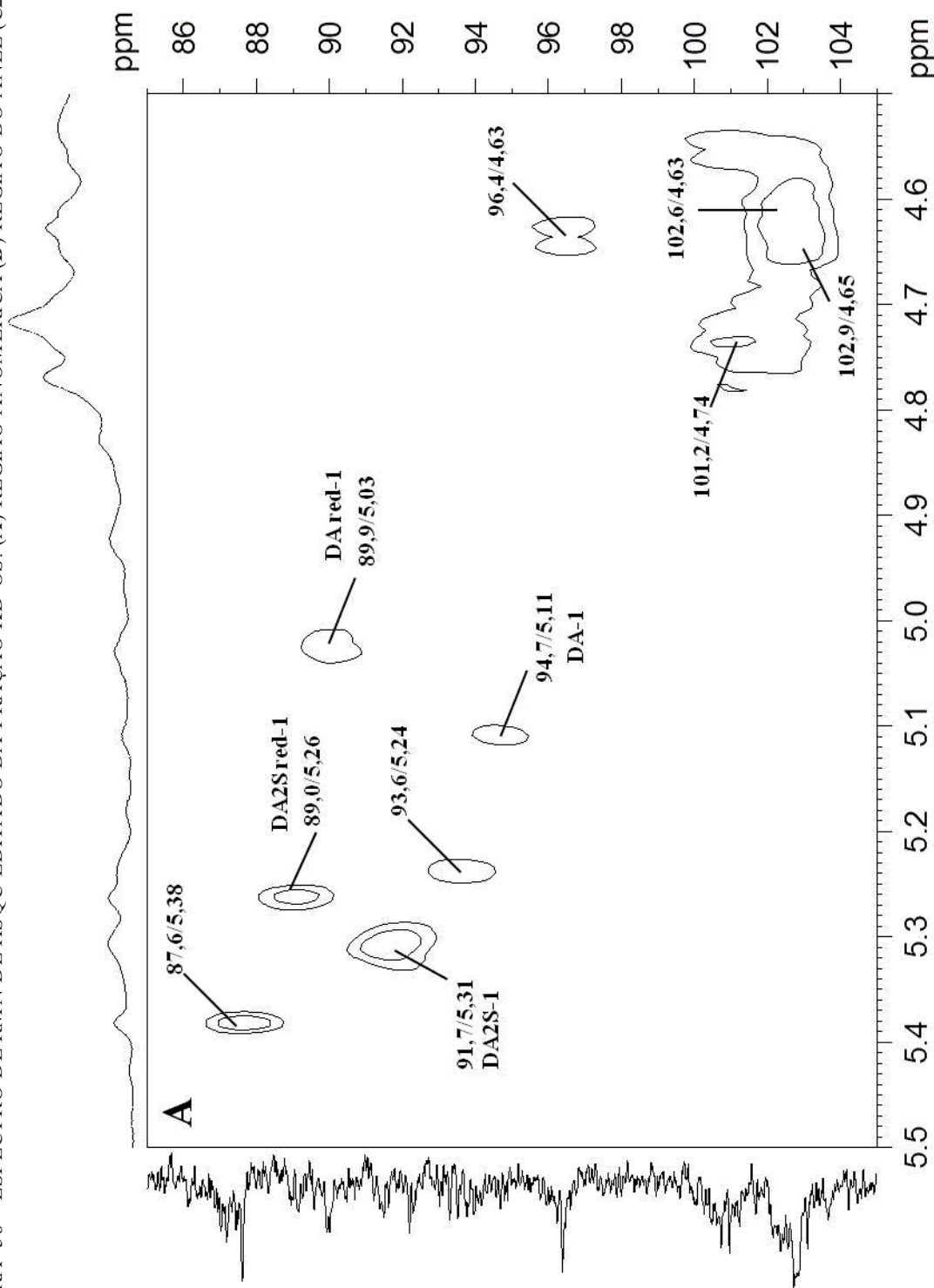
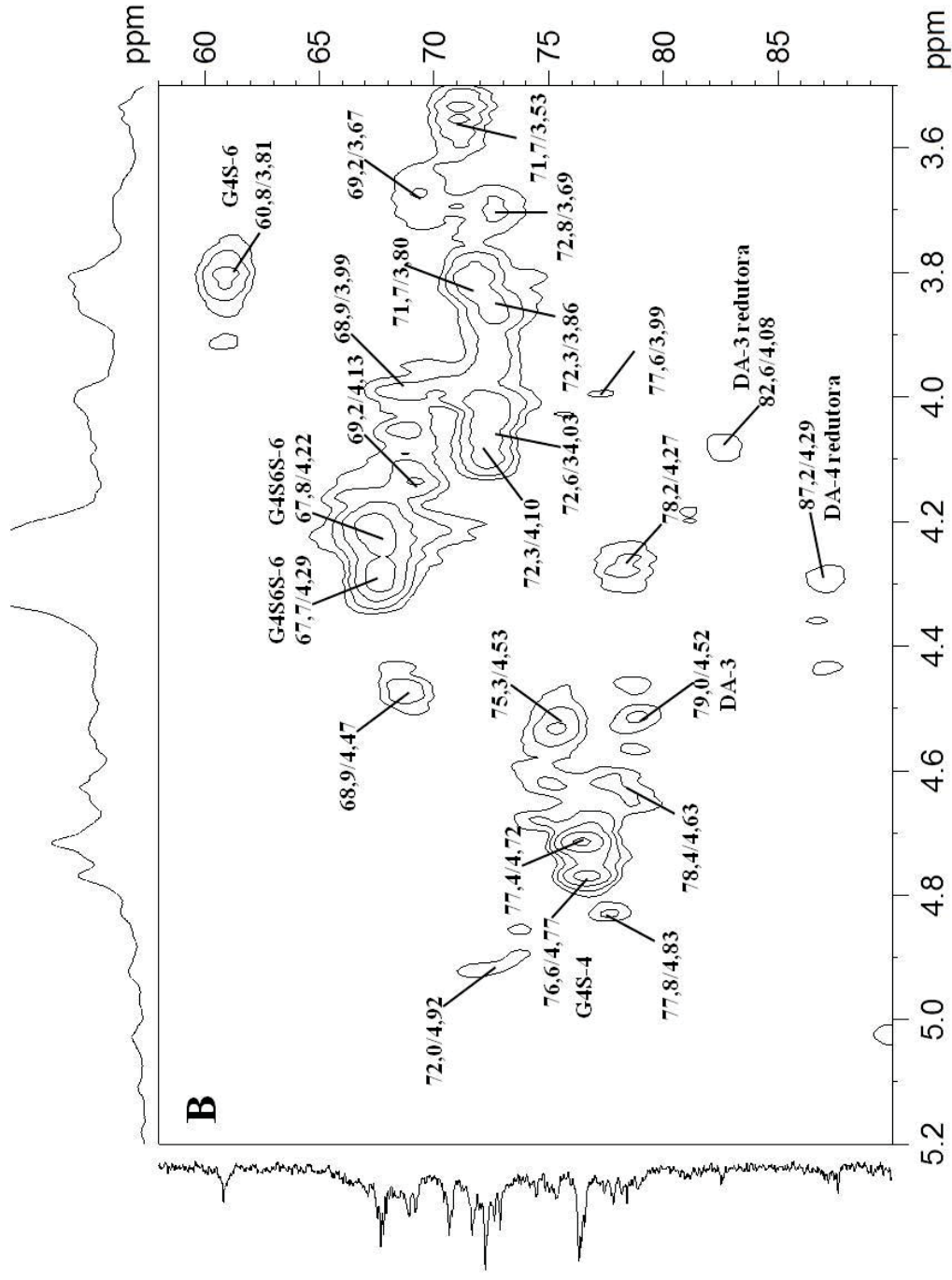
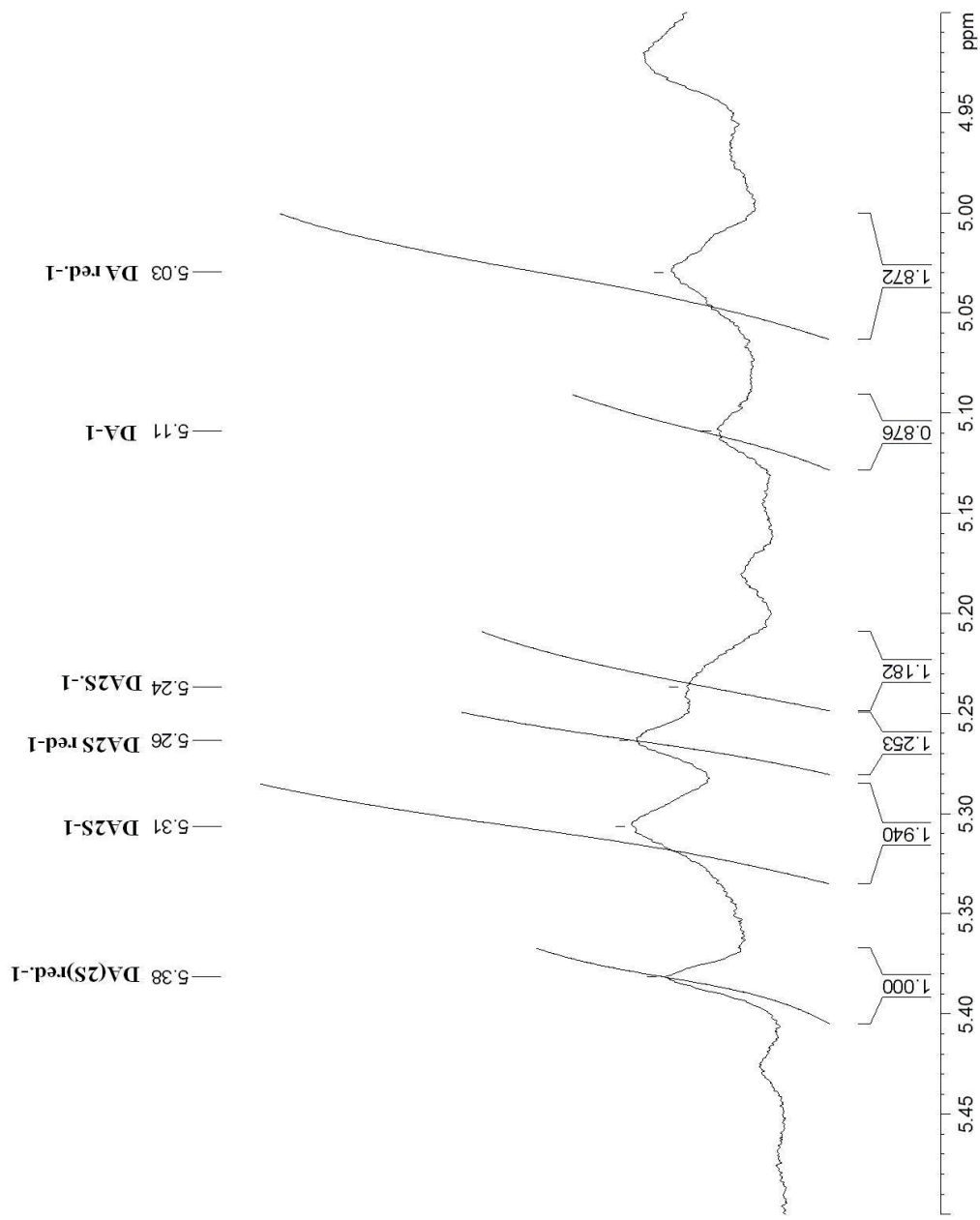
FIGURA 55 – ESPECTRO DE ^{13}C -DEPT E ^{13}C DA FRAÇÃO OLIGOSSACARÍDICA KD-OS

FIGURA 56 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC-EDITADO DO FRAÇÃO KD-OS. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6)



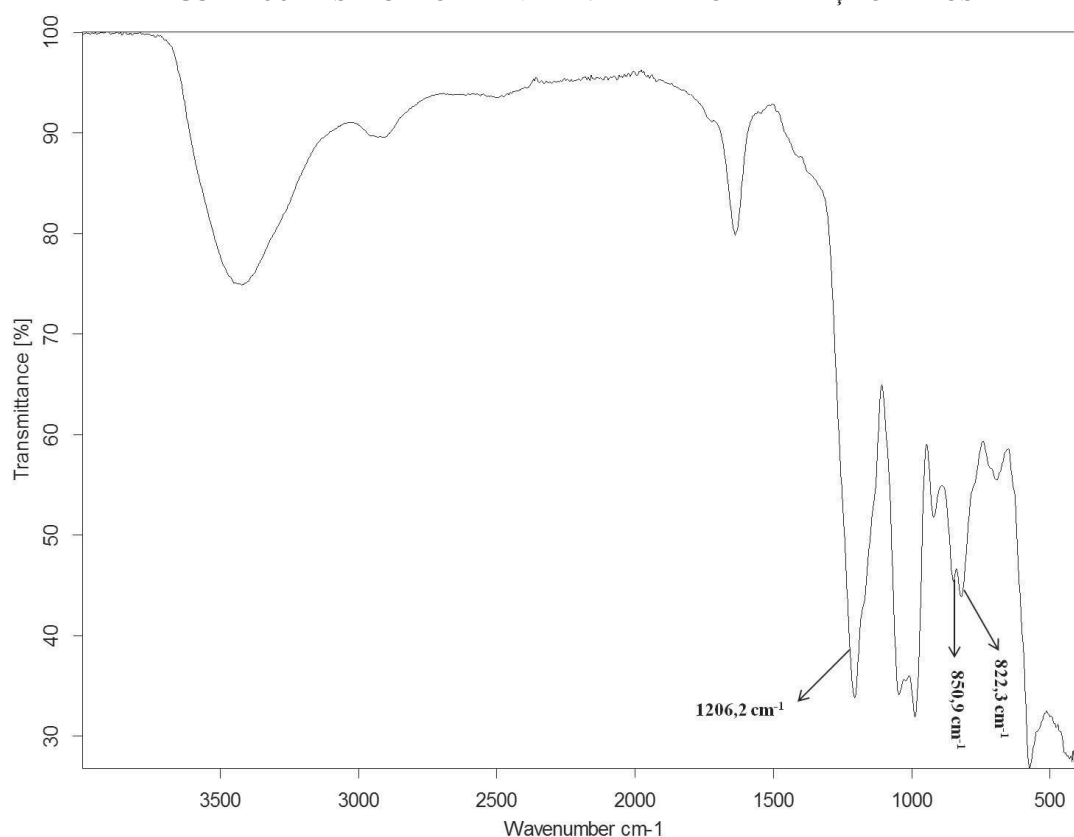


Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (30,2/2,224). G2S, G4S, G6S, G4S, G6S, DA2S redutora e DA redutora representam os C/H das unidades β-D-galactopiranoose 2-sulfato, β-D-galactopiranoose 4-sulfato, β-D-galactopiranoose 6-sulfato, β-D-galactopiranoose 4,6-disulfato, 3,6-anidro-D-galactose 2-sulfato redutora e 3,6-anidro-D-galactose redutora, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 57 – INTEGRAÇÕES DE RMN DE ^1H DOS HIDROGÊNIOS ANÔMERICOS DAS UNIDADES DE 3,6-ANIDRO-D-GALACTOSE DA FRAÇÃO KD-OS

Solvente: D_2O , 70°C ; acetona como padrão interno (2,224). DA2S-1 e DA-1 representam os hidrogênios das unidades 3,6-anidro-D-galactose 2-sulfato redutora e 3,6-anidro-D-galactose redutora, respectivamente.

FIGURA 58 – ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DA FRAÇÃO KD-OS



Wavenumber: número de onda; *Transmittance*: transmitância. FONTE: O autor (2018).

Sendo assim, conclui-se que a fração hidrolisada KD-OS é constituída por uma mistura de oligossacarídeos, apresentando sulfato nas posições, C2 e C6 das unidades de 3,6-anidro-D-galactose e β -D-galactopiranoose, respectivamente.

Da mesma forma que a fração KD, a fração KD-OS apresenta suas extremidades reductoras. Estes oligossacarídeos sulfatados, podem ser utilizados na produção de polissacarídeos híbridos a partir do polissacarídeo neutro (agarose), poliuronídeo (alginato) e carboxilados sulfatados (ulvana), a fim de agregar características químicas e biológicas destes materiais, aumentando o potencial biológico e farmacológico destes polissacarídeos híbridos.

4.2 ALGINATO DE SÓDIO – CARACTERIZAÇÃO, PRODUÇÃO DE BLOCOS HOMOPOLIMÉRICOS, AMIDAÇÃO E SEMISSÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS

4.2.1 Caracterização química e espectroscópica do alginato de sódio

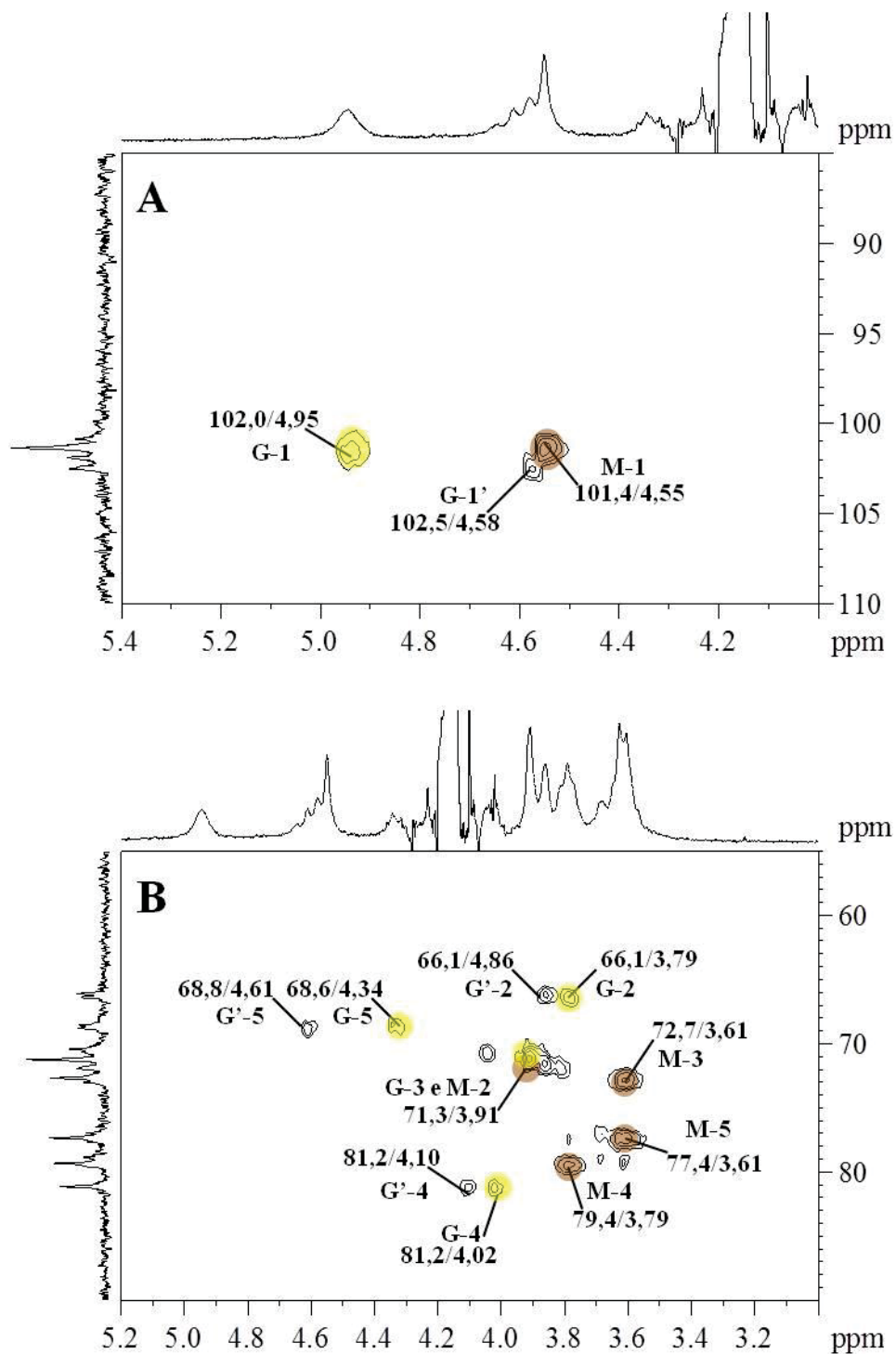
As análises de RMN de ^{13}C , ^1H e HSQC do Alg-Na forneceram espectros similares aos reportados na literatura para o alginato de sódio. O espectro de HSQC (FIGURA 59 A) apresenta duas correlações principais na região anomérica, em 102,0/4,95 e 101,40/4,55 ppm, correspondentes as unidades 4-ligadas de α -L-gulupiranosidurônico (G) e β -D-manupiranosidurônico (M), respectivamente, constituindo os blocos homopoliméricos (BG e BM), respectivamente. Adicionalmente, a correlação anomérica em 102,4/4,58 ppm foi atribuída a unidades de α -L-gulupiranosidurônico, constituindo os blocos heteropoliméricos (BGM). Estes assinalamentos estão de acordo com o reportado na literatura (GRASDALEN, 1983; HAUG; LARSEN; SMIDSRØD, 1966; DUARTE; GORIN; DUARTE, 1991; TAKO; YOZA; TOHMA, 2000).

Na FIGURA 59 (B), além das correlações C2/H2 – C5/H5 referentes aos blocos homopoliméricos BG e BM, foi possível identificar as correlações em 66,1/4,86, 81,4/4,10 e 68,8/4,61 ppm atribuídas aos C2/H2 C4/H4 e C5/H5, respectivamente das unidades de α -L-gulupiranosidurônico (α -L-GulAp), ligado a unidades de β -D-manupiranosidurônico (β -D-ManAp), constituintes dos blocos heteropoliméricos BGM (GRASDALEN, 1983)

O espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 60) apresenta cinco sinais na faixa de 176,6 – 176,0 ppm atribuídos aos carbonos carbonílicos do alginato de sódio (DUARTE; GORIN; DUARTE, 1991; TAKO; YOZA; TOHMA, 2000).

GRASDALEN (1983) descreve que além da estrutura primária e das conformações de cadeira das unidades monossacarídica do polímero, uma contribuição na mudança do deslocamento químico dos hidrogênios nos blocos homopoliméricos para os heteropoliméricos, pode surgir do efeito da blindagem nuclear devido a proximidade dos hidrogênios à grupos eletronegativos. Em uma ligação [4)- α -L-GulAp-(1 \rightarrow 4)- β -D-ManAp-(1 \rightarrow], o H-5 da unidade G está mais próximo (3 Å) da hidroxila em C3 da unidade M, do que em uma ligação [4)- α -L-GulAp-(1 \rightarrow 4)- α -L-GulAp-(1 \rightarrow], onde o H-5 da unidade G está mais distante (4 Å) da hidroxila em C2 da unidade vizinha G, como demonstrado na FIGURA 61. Desta forma, a proximidade do grupo eletronegativo (hidroxila em C2) da unidade M, afeta mais significativamente o deslocamento químico do H-5, do que quando a unidade vizinha é outra unidade G. De acordo com GRASDALEN (1983) os assinalamentos dos H-5, dos bloco BG e BGM foram de 4,34 e 4,61 ppm, respectivamente (TABELA 17)

FIGURA 59 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DO ALGINATO DE SÓDIO. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5)



Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,10). G-1 – G-5, M-1 – M-5, G'-1 – G'-5 representam os C/H das unidades de α -L-GulAp e β -D-ManAp constituindo os blocos BG, BM, e BGM, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

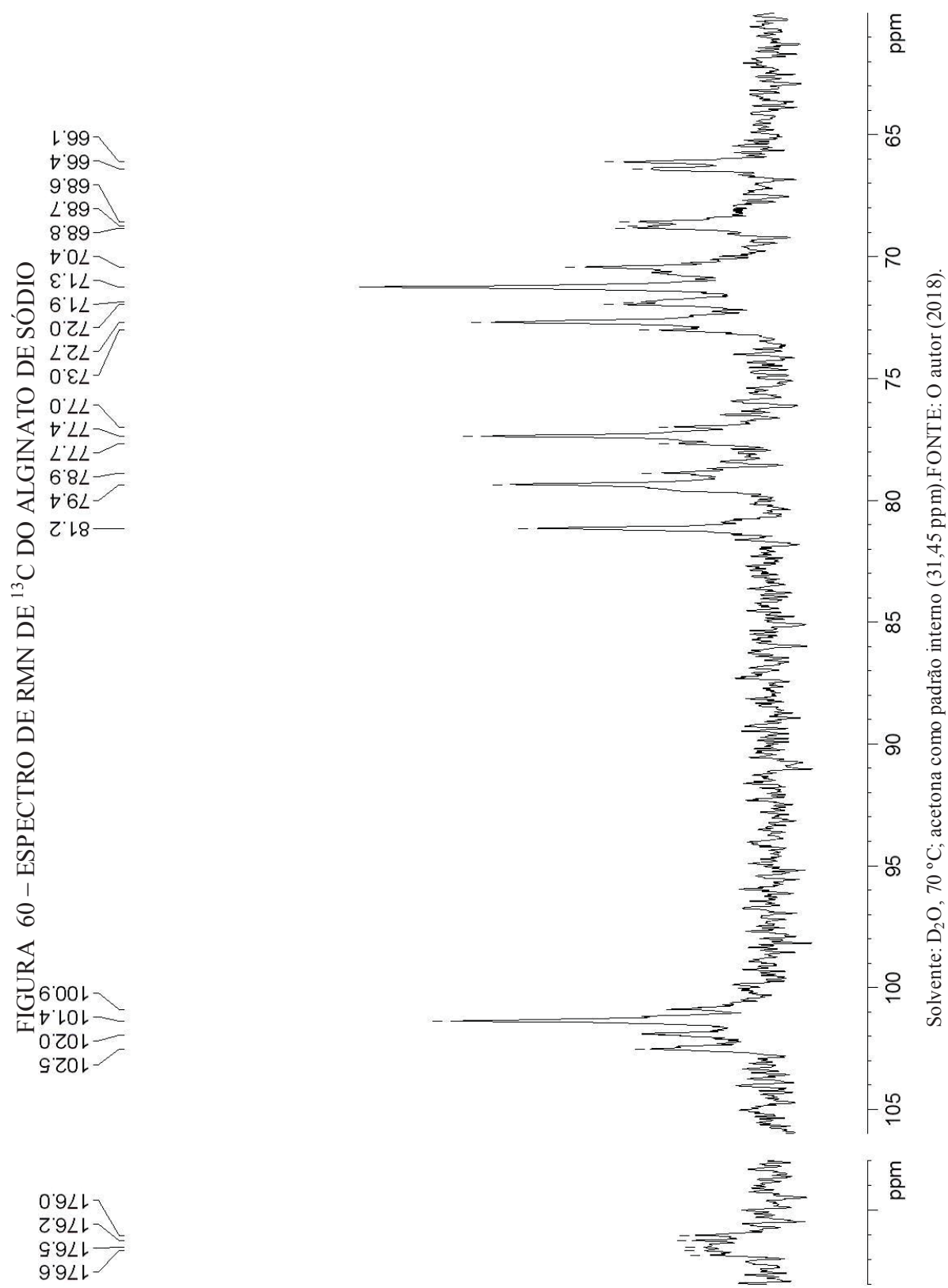
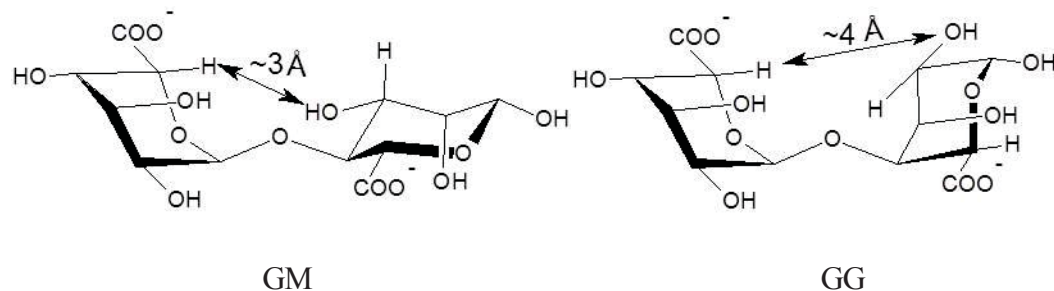


FIGURA 61 – EFEITO DA BLINDAGEM NUCLEAR CAUSADA PELA PROXIMIDADE DOS HIDROGÊNIOS AOS GRUPOS ELETRONEGATIVOS NOS BLOCOS HETEROPOLIMÉRICOS (GM) E HOMOPOLIMÉRICOS (GG)



FONTE: GRASDALEN, 1983.

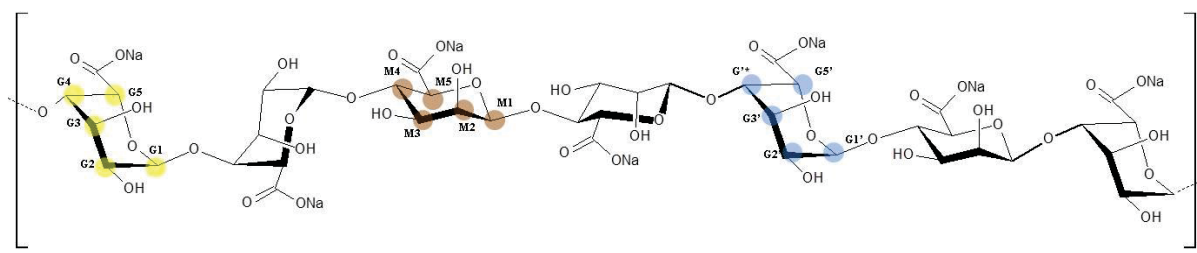
Na TABELA 17 estão apresentados os assinalamentos das unidades de α -L-GulAp e β -D-ManAp, quando compõem os blocos homopoliméricos GG e MM, e heteropoliméricos GM no alginato de sódio (Alg-Na). Na FIGURA 62 está representada a estrutura química dos blocos que constituem a fração Alg-Na.

TABELA 17 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS UNIDADES DE α -L-GULUPIRANOSIDURÔNICO (G) E β -D-MANUPIRANOSIDURÔNICO (M) NO ALGINATO DE SÓDIO

Unidade	Blocos		^{13}C	^1H
[\rightarrow 4)- α -L-GulAp-(1 \rightarrow]	BG	1	102,0	4,95
		2	66,1	3,79
		3	71,3	3,91
		4	81,2	4,02
		5	68,8	4,34
		6	176,2	-
[\rightarrow 4)- β -D-ManAp-(1 \rightarrow]	BM	1	101,4	4,55
		2	72,7	3,61
		3	71,3	3,91
		4	79,4	3,79
		5	77,4	3,61
		6	176,0	-
[\rightarrow 4)- α -L-GulAp-(1 \rightarrow \rightarrow 4)- β -D-ManAp-(1 \rightarrow)] *	BGM	1'	102,5	4,58
		2'	66,1	4,86
		3'	n.d.	n.d.
		4'	81,2	4,10
		5'	68,8	4,61
		6'	n.d.	n.d.

n.d.= não determinado. BG, BM e BGM correspondem respectivamente aos blocos homopoliméricos e heteropoliméricos da constituintes do alginato de sódio e * referente a unidades de α -L-GulAp. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 62 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DO ALGINATO DE SÓDIO



G1-G5, M1-M5, G'1-G'5 representam os C/H das unidades de α -L-GulAp e β -D-ManAp constituindo os blocos BG, BM, e BGM, respectivamente da fração Alg-Na. FONTE: O autor (2018).

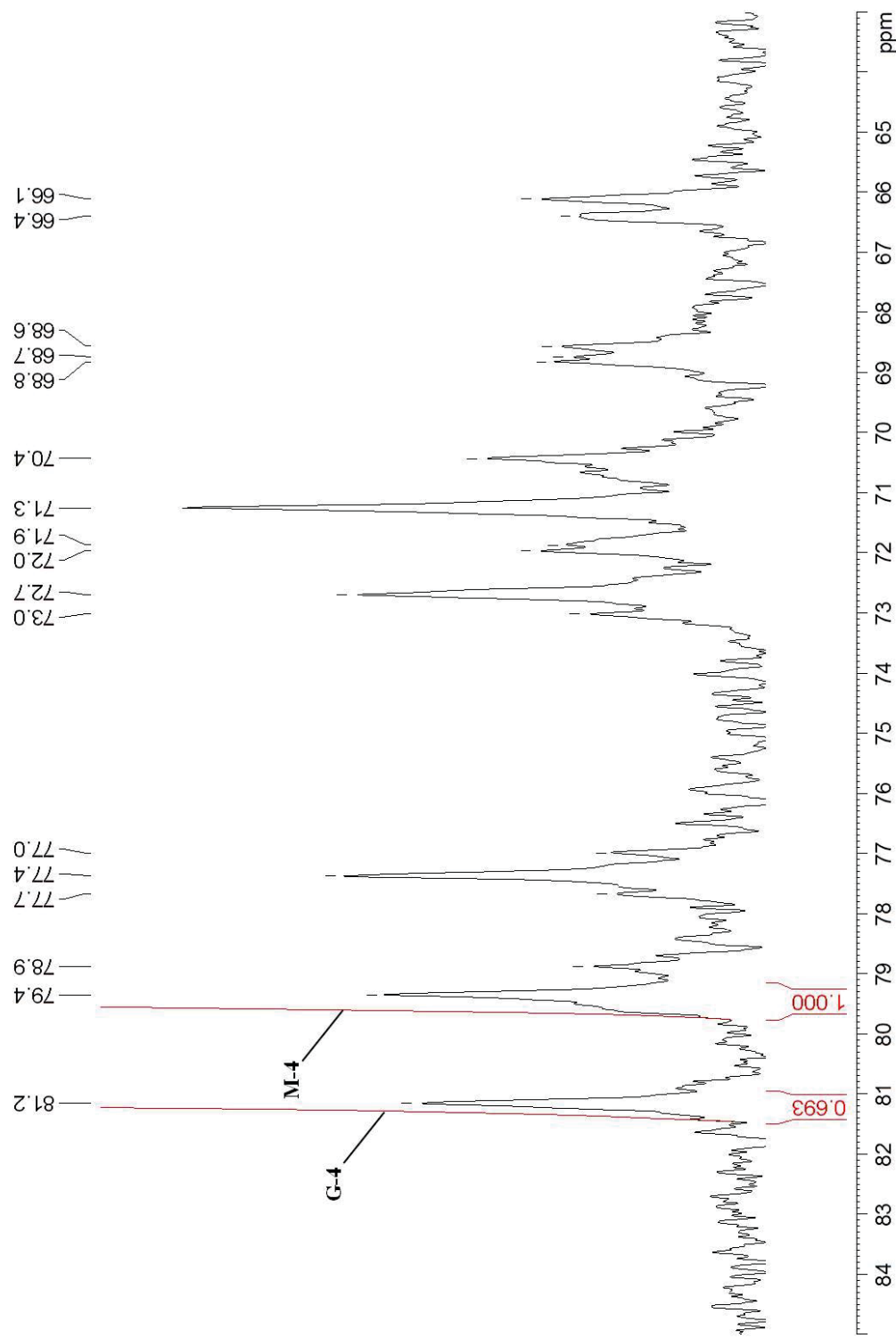
A relação dos monossacarídeos M/G do Alg-Na foi determinada no presente trabalho, a partir da integração dos carbonos-4 presentes no espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 63). A relação resultante da integração dos sinais em 79,4 e 81,2 ppm (C4 do ácido β -D-manurônico e do ácido α -L-gulurônico, respectivamente), é de 1,44:1 de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico. Esta metodologia de determinação de M/G para o alginato de sódio foi descrita por IKEDA e colaboradores (2000), onde os autores reportaram uma relação de 2,11:1 de ácido manurônico e ácido gulurônico, presentes no alginato de sódio comercial da marca Nicca chemical CO., LTD (Japão).

Alginatos de diferentes espécies de macroalgas marinhas apresentam diferentes percentagens de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico. A relação M/G pode ainda ser alterada de acordo com a sazonalidade, local de coleta, bem como com a parte da alga utilizada para sua extração. FERTAH e colaboradores (2017) relataram uma relação M/G de 2,11 para alga *Laminaria digitata* coletada no inverno a partir da costa atlântica do Marrocos ocidental. PAPAGEORGIOU, KOUVELOU e KATSAROS (2008), observaram uma relação de 1,5 para a mesma espécie coletada de áreas costeiras da França, enquanto GRASDALEN, LARSEN e SMIDSRØD (1979), reportaram um M/G de 1,6 para mesma espécie. Outras espécies de macroalgas pardas também apresentam esta variação na relação de ácido manurônico e ácido gulurônico, como descrito por PENMAN e SANDERSON (1972), que obtiveram a relação de 1,36 – 1,67 para o alginato de *Ascophyllum nodosum*, NAI-YU e colaboradores (1994), que para diferentes espécies de macroalga *Sargassum*, reportaram distintos valores de M/G, entre eles 1,5; 1,27 e 1,22 para as espécies *S. pallidum*, *S. thunbergii* e *S. kjellmanianum*, respectivamente.

Além da determinação da relação de M/G obtida pela integração das áreas dos C4 das unidades de M e G no espectro de RMN de ^{13}C , existem outras metodologias para

determinar a composição de ácidos urônicos em polissacarídeos. Uma delas é o processo de hidrólise, redução e acetilação, para obtenção dos correspondentes acetatos de alditois analisados por GC-MS. Porém durante o processo de hidrólise ácida, o percentual de liberação dos ácidos urônicos é baixo, apresentando como resposta uma relação subestimada. Este baixo percentual de hidrólise do alginato de sódio é o resultado da alta resistência das ligações glicosidurônicas, aliado a maior velocidade de degradação do ácido α -L-gulurônico quando comparado à do ácido β -D-manurônico (HAUG et al., 1962; DUARTE, 1990).

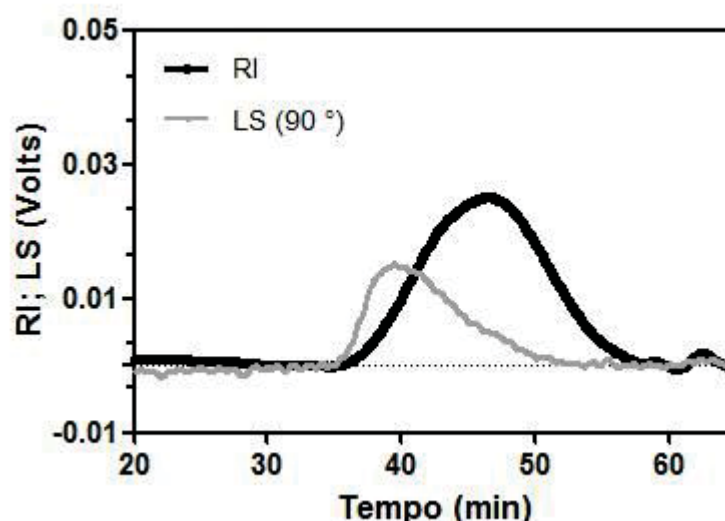
Outro método de determinação da relação M/G, que facilita a despolimerização quantitativa dos urônicos poliméricos, em condições de hidrólises que não degradem os monossacarídeos, é convertê-los em ésteres utilizando carbodiimida e posteriormente reduzi-los aos monossacarídeos neutros, que são mais facilmente hidrolisáveis (TAYLOR e CONRAD, 1972).

FIGURA 63 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO ALGINATO DE SÓDIO REGIÃO DO ANEL (C2-C5)

Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (31,45). G4 e M4 representam os carbonos das unidades de $\alpha\text{-L-GulAp}$ e $\beta\text{-D-ManAp}$, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

A FIGURA 64 demonstra o cromatograma de HPSEC-MALLS-RI para o polissacarídeo Alg-Na. O perfil de índice de refração (RI) mostra a base simétrica (tempo de retenção 46,17 min) demonstrando um perfil homogêneo. A massa molar ponderal média (M_w) foi estimada através da curva padrão de dextranas, resultando no M_w de $2,1 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, estando de acordo com o relatado na literatura. CHHATBAR e colaboradores (2012), estimaram a massa molecular ponderal média do alginato de sódio extraído da macroalga parda *Sargassum tenerrimum* (coletada em Gujarat na costa da Índia), através de curva padrão de dextranas, reportando o M_w em $2,2 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, e CHEJARA e colaboradores (2013), estimaram a M_w do alginato de sódio obtido comercialmente da empresa M/s Sisco Research Laboratories (SRL), utilizando espalhamento de luz em $2,4 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$.

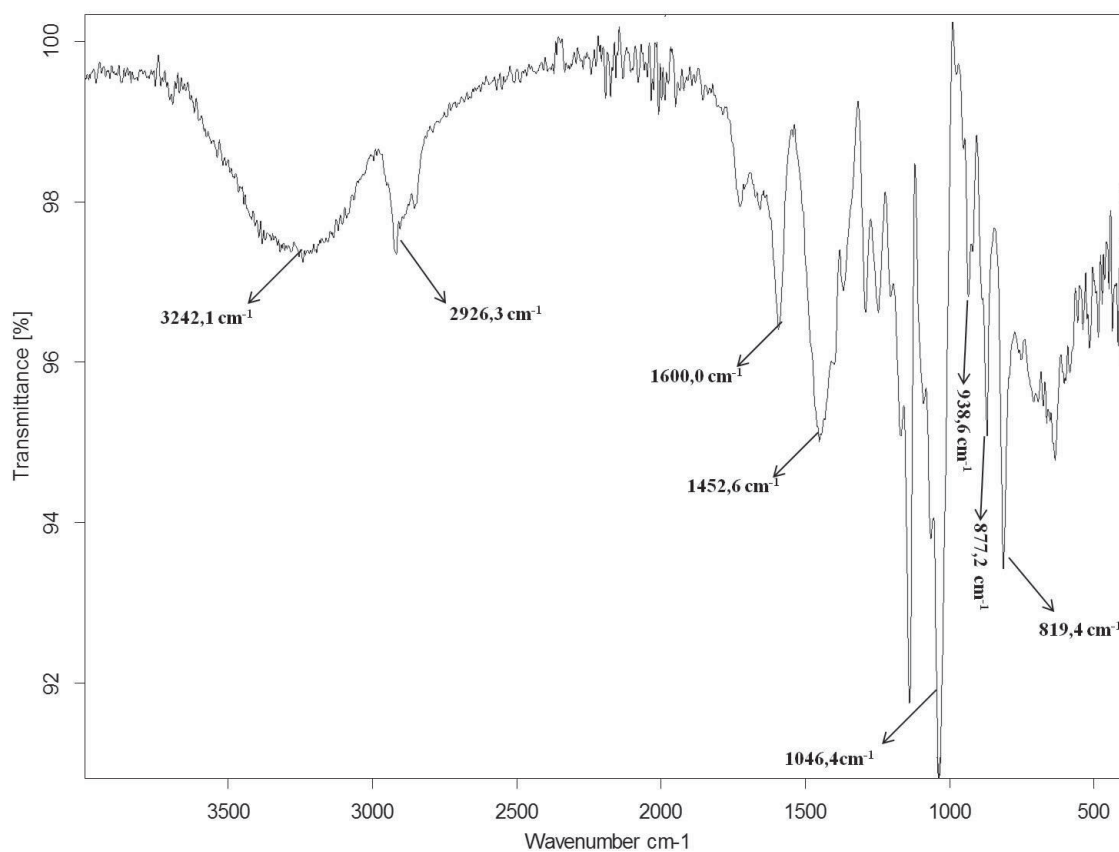
FIGURA 64 – HPSEC-MALLS-RI DO ALGINATO DE SÓDIO



RI: refractive index; LS: Laser-light scattering. FONTE: O autor (2018).

No espectro de infravermelho do Alg-Na (FIGURA 65) foi possível observar bandas características como: $3242,1 \text{ cm}^{-1}$ (O-H estiramento vibracional), $2926,3 \text{ cm}^{-1}$ (C-H estiramento vibracional), $1600,0 \text{ cm}^{-1}$ (O-C-O estiramento vibracional assimétrico do carboxilato), $1452,6 \text{ cm}^{-1}$ (C-C deformação), $1046,4 \text{ cm}^{-1}$ (C-O-C estiramento vibracional), $938,6 \text{ cm}^{-1}$ (C-O estiramento vibracional de ácidos urônicos), $877,2 \text{ cm}^{-1}$ (C1-H deformação vibracional do ácido β -D-manurônico) e $819,4 \text{ cm}^{-1}$ (característico de ácido manurônico). (CHHATBAR et al., 2012; LEAL et al., 2008; MATSUHIRO; VA; CHANDÕ, 2001)

FIGURA 65 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO ALGINATO DE SÓDIO



Wavenumber: número de onda; Transmittance: transmitância. FONTE: O autor (2018).

4.2.2 Produção dos blocos homopoliméricos a partir de Alg-Na

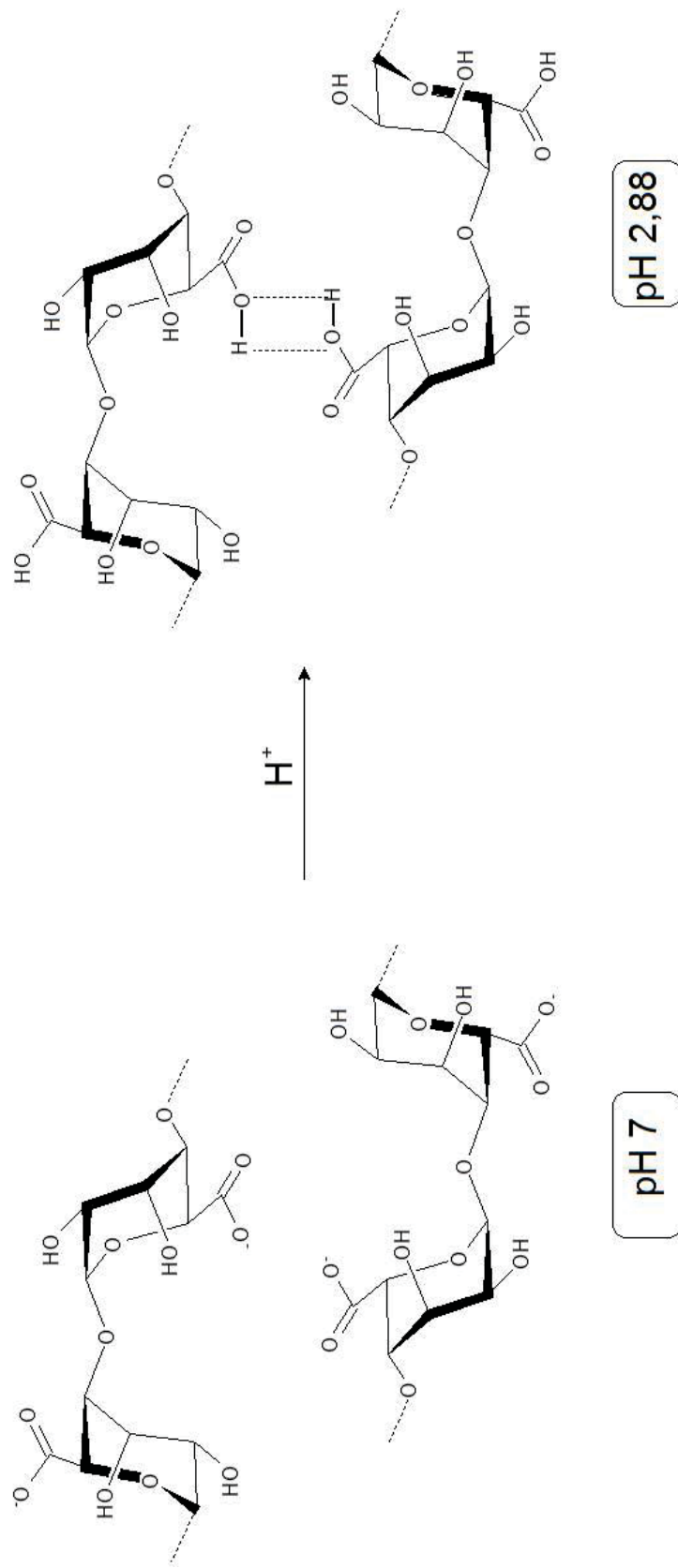
No presente trabalho a obtenção de blocos homopoliméricos constituídos por ácido β -D-manurônico (BM) e ácido α -L-gulurônico (BG), foi realizada de acordo com o método de hidrólise ácida parcial com ácido oxálico como descrito por HAUG, LARSEN e SMIDSRØD (1966). Embora os ácidos α -L-gulurônico e β -D-manurônico sejam epímeros em C5/H5, eles apresentam propriedades diferentes (HAUG e LARSEN, 1962), como a capacidade de formar hidrogéis na presença de cátions divalentes apresentada pelo bloco BG (GRANT, MORRIS E REES, 1973).

O alginato de sódio (Alg-Na) foi submetido ao processo de hidrólise ácida parcial com ácido oxálico 1 mol L⁻¹ por 20 h à 100 ° C, em refluxo, originando duas frações: FS (12,4%) e FI (4,3%), sendo as frações solúvel e insolúvel, respectivamente. Este rendimento de recuperação, estão de acordo com os obtidos por DUARTE, GORIN e DUARTE (1991), que produziram blocos homopoliméricos, do tipo BG e BM, a partir da alga parda *Laminaria brasilienses* (12,0% de recuperação na fração solúvel, e 4,3% na fração insolúvel).

Embora os ácidos urônicos, constituintes do alginato de sódio, apresentem constantes de dissociação (pKa) diferentes com valores de 3,38 e 3,65, para o ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico, respectivamente, esta precipitação em função do pH não pode ser explicada apenas pela diferença de pKa (HAUG e LARSEN, 1962). Esta precipitação pode ocorrer devido as diferentes disposições espaciais dos monômeros M e G. Os blocos BM apresentam-se na posição de cadeira 4C_1 com ligações glicosídicas diequatoriais $\beta(1\rightarrow4)$, enquanto os blocos BG, apresentam-se na posição de cadeira 1C_4 , com ligações glicosídicas diaxiais $\alpha(1\rightarrow4)$ (DUNFIELD; WHITTINGTON, 1974), fazendo com que os poligulurônicos se organizem em forma de hastes (DAVIS; VOLESKY; MUCCI, 2003). Quando as moléculas de ácido α -L-gulurônico estão em soluções ácidas, abaixo do pKa, elas se encontram totalmente protonadas, causando uma interação por ligações de hidrogênio através das carboxilas protonadas, diminuindo sua solubilidade, e por consequência ocorrendo a precipitação, como demonstrado na FIGURA 66, a interação entre as unidades de ácido α -L-gulurônico em diferentes pH, acima (pH 7) e abaixo do pKa (2,88).

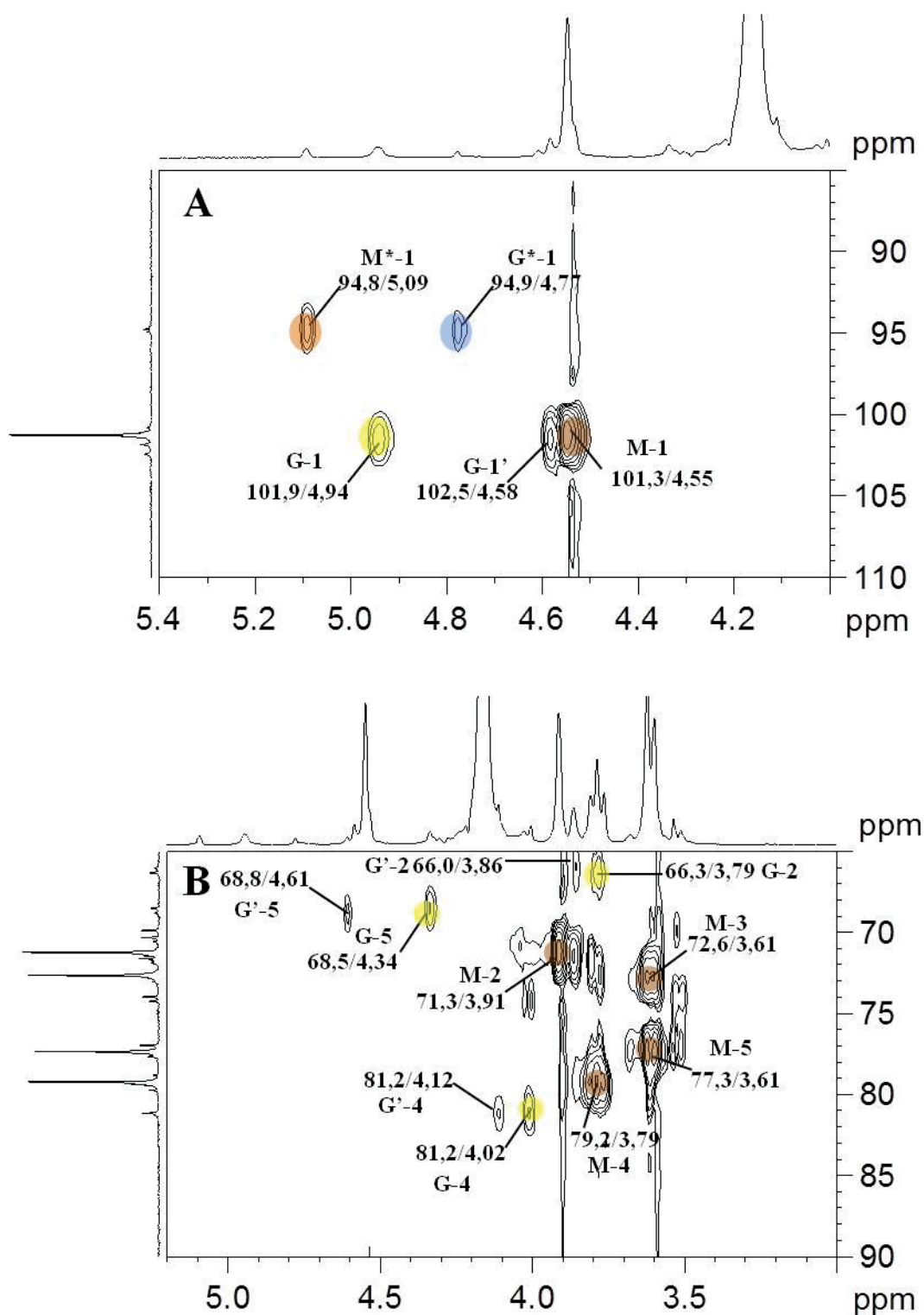
Na FIGURA 67, é demonstrado o espectro de RMN de HSQC da fração FS solúvel. Na região anomérica (FIGURA 67 A), as correlações em 101,3/4,55 e 94,8/5,09 ppm correspondem as unidades de ácido β -D-manurônico 4-ligadas e ácido D-manurônico terminal redutor, respectivamente. As correlações em 71,3/3,91, 72,6/3,61, 79,2/3,79 e 77,3/3,61 ppm foram atribuídas aos C2/H2, C3/H3, C4/H4 e C5/H5, respectivamente, das unidades de ácido β -D-manurônico (BM). A FIGURA 68 apresenta o espectro de RMN de ${}^{13}C$ da fração FS, dando destaque ao sinal do carbono carboxílico do ácido β -D-manurônico em 176,0 ppm. Estes assinalamentos estão de acordo com o obtido por DUARTE, GORIN e DUARTE (1991).

FIGURA 66 – INTERAÇÃO ENTRE AS UNIDADES DE ÁCIDO α -L-GULURÔNICO EM DIFERENTES pHs

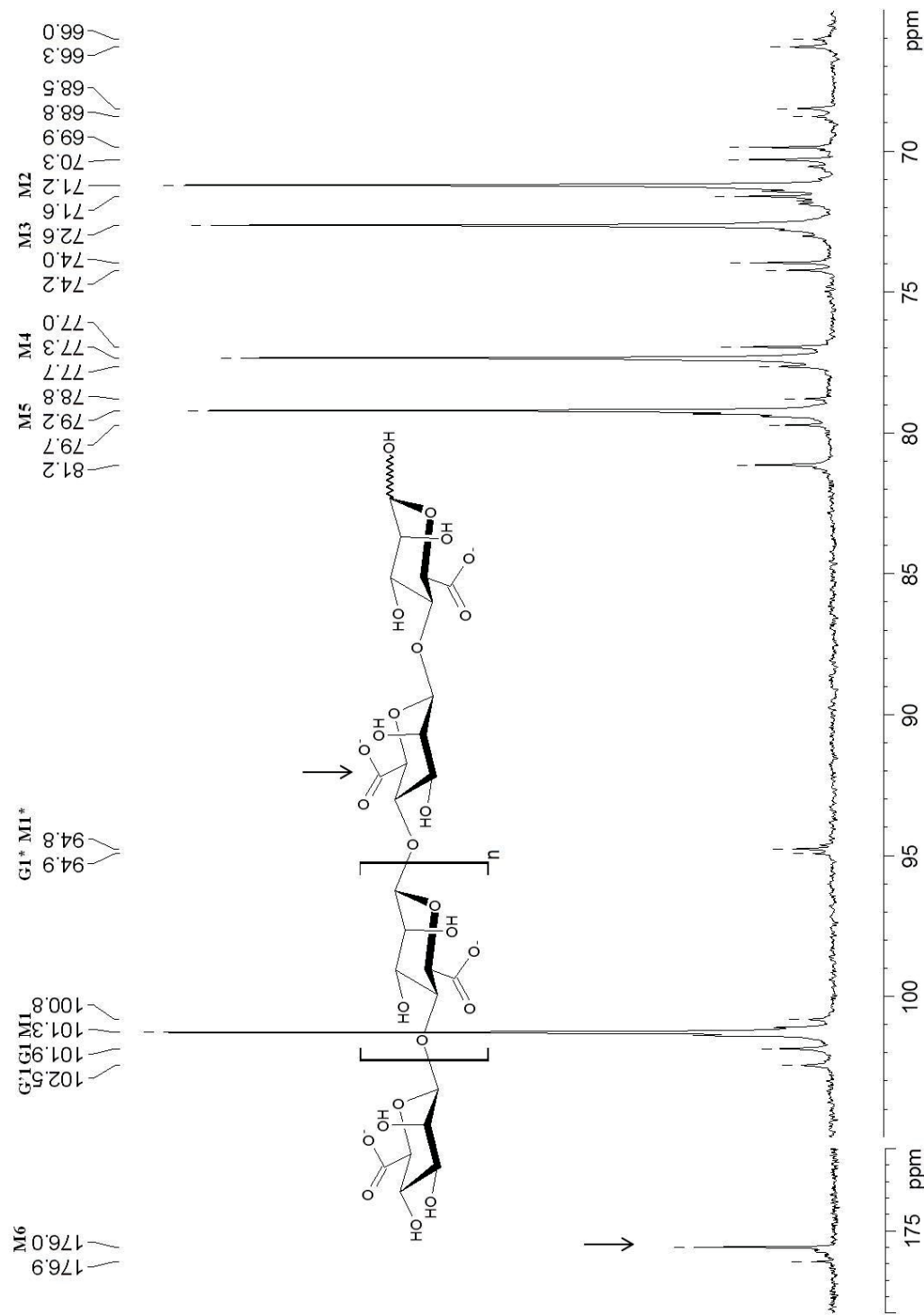


FONTE: O autor (2018).

FIGURA 67 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO FS (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5)



Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,10). M-1 – M-5, M*-1, G-1 – G5 e G'1 – G'-5 e G*-1 representam os C/H das unidades de β -D-ManAp 4-ligada (BM), D-ManAp terminal redutor, α -L-GulAp 4-ligada (BG), α -L-GulAp 4-ligada (BGM) e L-GulAp terminal redutor, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

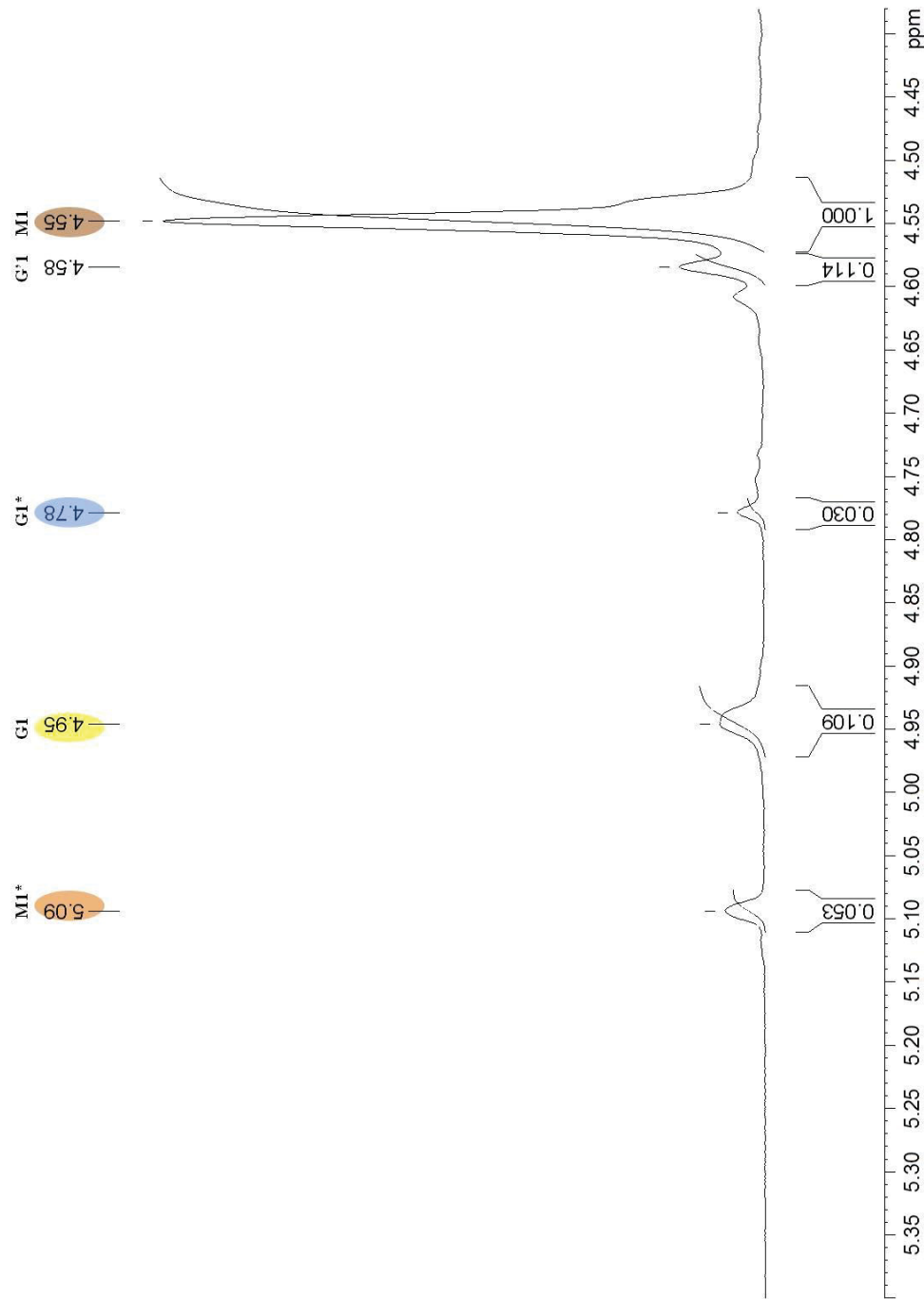
FIGURA 68 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO FS

Solvente: D_2O , 70 °C, acetona como padrão interno (31,45). M1-M6, M1*, G1, G'1 e G1* representam os carbonos das unidades de β -D-ManAp 4-ligada (BM), D-ManAp terminal redutor, α -L-GulAp 4-ligada (BG), α -L-GulAp terminal redutor, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

Além dos sinais característicos de blocos homopoliméricos BM, os espectros de RMN (FIGURA 67 e 68) da fração FS apresentaram adicionalmente sinais referentes ao ácido α -L-gulurônico. As correlações em 101,9/4,95, 102,5/4,58 e 94,9/4,77 ppm foram atribuídas aos C1/H1 de unidades do ácido α -L-gulurônico 4-ligada de blocos homopoliméricos (BG), ácido α -L-gulurônico 4-ligada de blocos heteropoliméricos (BGM) e ácido α -L-gulurônico terminais redutores, respectivamente (FIGURA 10) (GRASDALEN, 1983; DUARTE; GORIN; DUARTE, 1991; ZHANG et al., 2004).

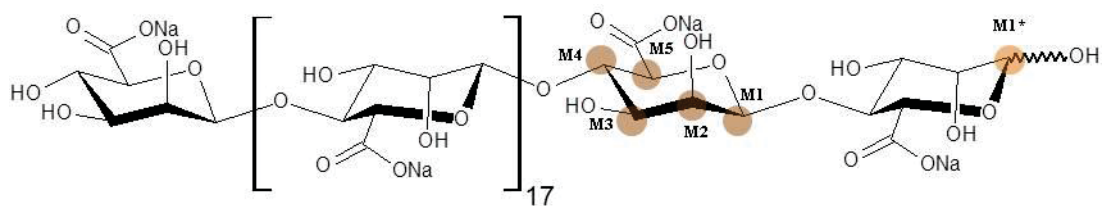
O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 69) apresentou sinais correspondentes as unidades de ácido D-manurônico e ácido α -L-gulurônico redutores (5,09 e 4,77 ppm, respectivamente) e das unidades de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico (4,55 e 4,95 ppm, respectivamente). A integração destes sinais apresentou uma relação correspondente a 80,6:19,4 de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico. Desta maneira, a fração FS, é constituída por 81% de unidades de ácido β -D-manurônico 4-ligadas, constituindo os blocos homopoliméricos de ácido β -D-manurônico. Por esta razão a denominação clássica foi utilizada, ou seja, a fração FS foi renomeada como blocos BM.

A relação média do número de unidades de ácido β -D-manurônico constituintes do bloco BM foi determinada através da integração dos sinais anoméricos em 5,09 e 4,55 ppm no espectro de RMN de ^1H (FIGURA 69), correspondentes as unidades de ácido D-manurônico redutoras e ácido β -D-manurônico 4-ligadas, respectivamente. Desta forma a cada 20 unidades de ácido β -D-manurônico, 19 são 4-ligadas e uma é redutora, como demonstrado na FIGURA 70.

FIGURA 69 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO FS

Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (2,10). M1, M1* G1, G1* e G'1 representam os hidrogênios de: β -D-ManAp 4-ligadas, β -D-ManAp terminal redutora, α -L-GulAp 4-ligadas e α -L-GulAp terminal redutor, respectivamente, constituintes do bloco homopolimérico BM, enquanto que G'1 representa o hidrogênio de α -L-GulAp 4-ligadas constituintes dos heteropoliméricos, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 70 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO BLOCO BM



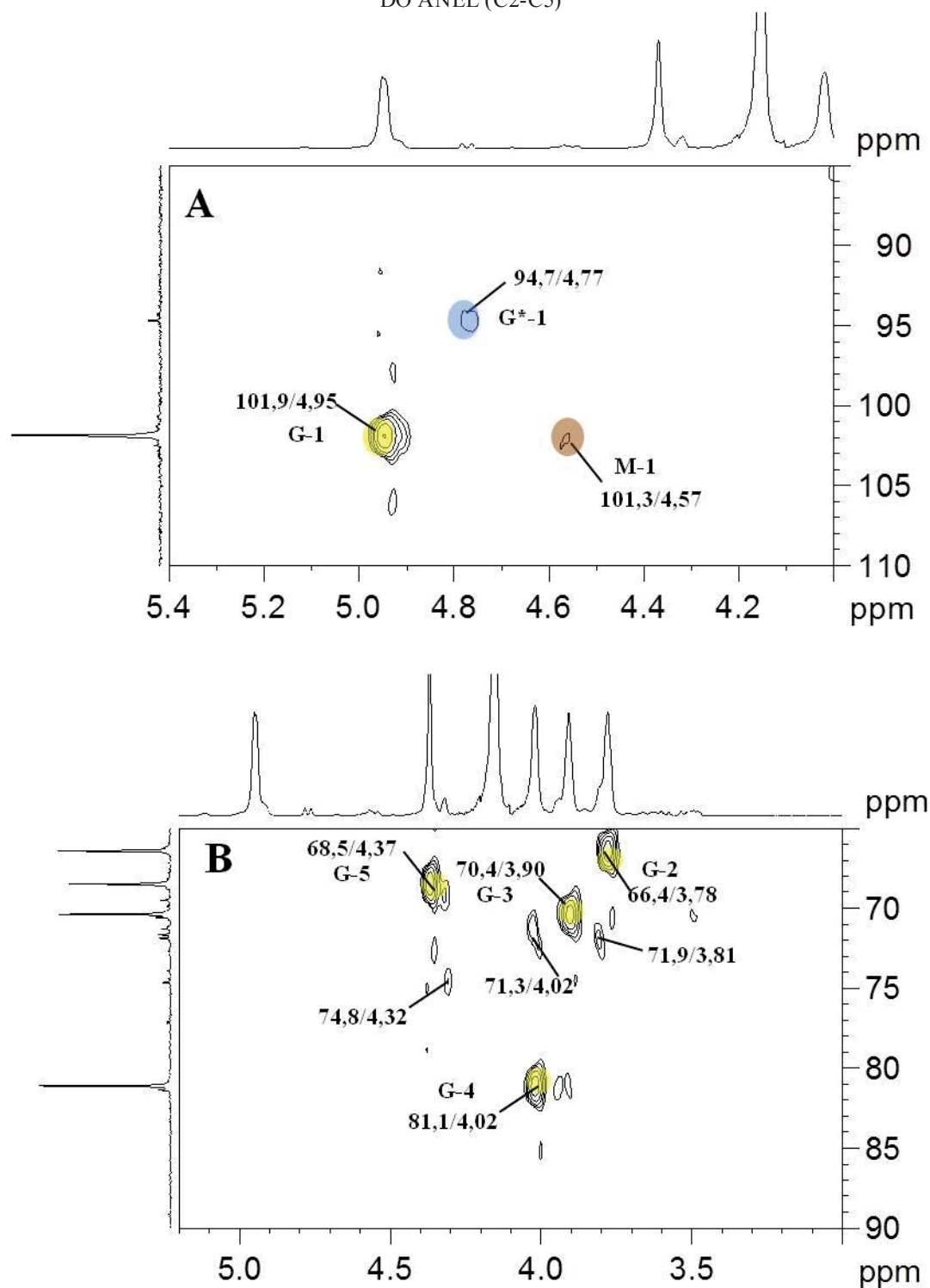
M1-M5 (●) e M1* (●) representam os C/H das unidades de β -D-ManAp 4-ligada e β -D-ManAp terminal redutor, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

O espectro de RMN de HSQC da fração insolúvel (FI) está representado na FIGURA 71. Este apresenta majoritariamente sinais correspondentes as unidades de ácido α -L-gulurônico 4-ligados. As correlações em 101,9/4,95 e 94,7/4,77 ppm foram atribuídas ao C1/H1 do ácido α -L-gulurônico 4-ligados e terminal redutor, respectivamente. Adicionalmente, ressonâncias em 66,4/3,78, 70,4/3,90, 81,1/4,02 e 68,5/4,37 ppm correspondem aos C2/H2, C3/H3, C4/H4 e C5/H5 das unidades de ácido α -L-gulurônico. O sinal em 175,9 ppm (FIGURA 72), corresponde ao carbono carboxílico do ácido α -L-gulurônico. Estes assinalamentos estão de acordo com os obtidos por DUARTE, GORIN e DUARTE (1991).

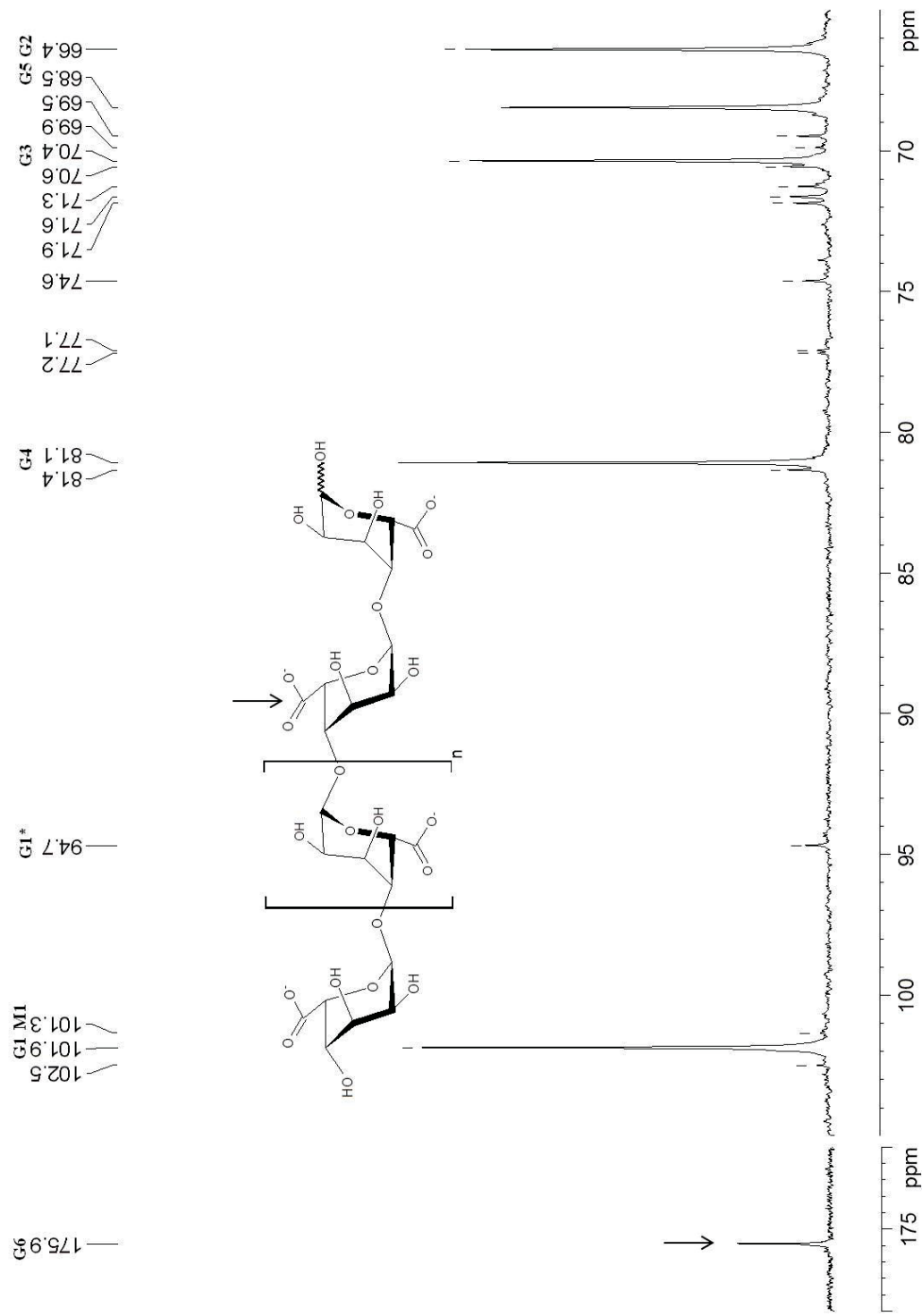
Além dos sinais característicos de blocos homopoliméricos BG, os espectros de RMN da fração FI (FIGURA 71 e 72) apresentam sinais referentes ao ácido β -D-manurônico. A correlação em 101,3/4,57 ppm, foi atribuída ao C1/H1 de unidades do ácido β -D-manurônico. A partir da integração dos sinais referentes ao H1 (RMN de ^1H na FIGURA 73) das unidades de ácido α -L-gulurônico 4-ligada (4,95 ppm), ácido L-gulurônico terminal redutor (4,77 ppm) e ácido β -D-manurônico 4-ligada (4,57 ppm), obteve-se uma relação das unidades de ácido α -L-gulurônico e ácido β -D-manurônico de 95,7:4,3. Deste modo, a fração FI é composta majoritariamente (95,7%) de unidades de ácido α -L-gulurônico 4-ligada constituindo os blocos homopoliméricos de ácido α -L-gulurônico, e por esta razão a fração FI foi renomeada para blocos BG.

A relação média do número de unidades de ácido α -L-gulurônico constituinte do bloco BG também foi determinada através da integração dos sinais anoméricos no espectro de RMN de ^1H (FIGURA 73) utilizando os sinais 4,95 e 4,77 ppm correspondentes as unidades de ácido L-gulurônico terminal redutor e ácido α -L-gulurônico 4-ligados, respectivamente, obtendo-se a relação de 19:1. Deste modo a cada 19 unidades de ácido α -L-gulurônico, 18 são 4-ligadas e uma é terminal redutor, como demonstrado na FIGURA 74.

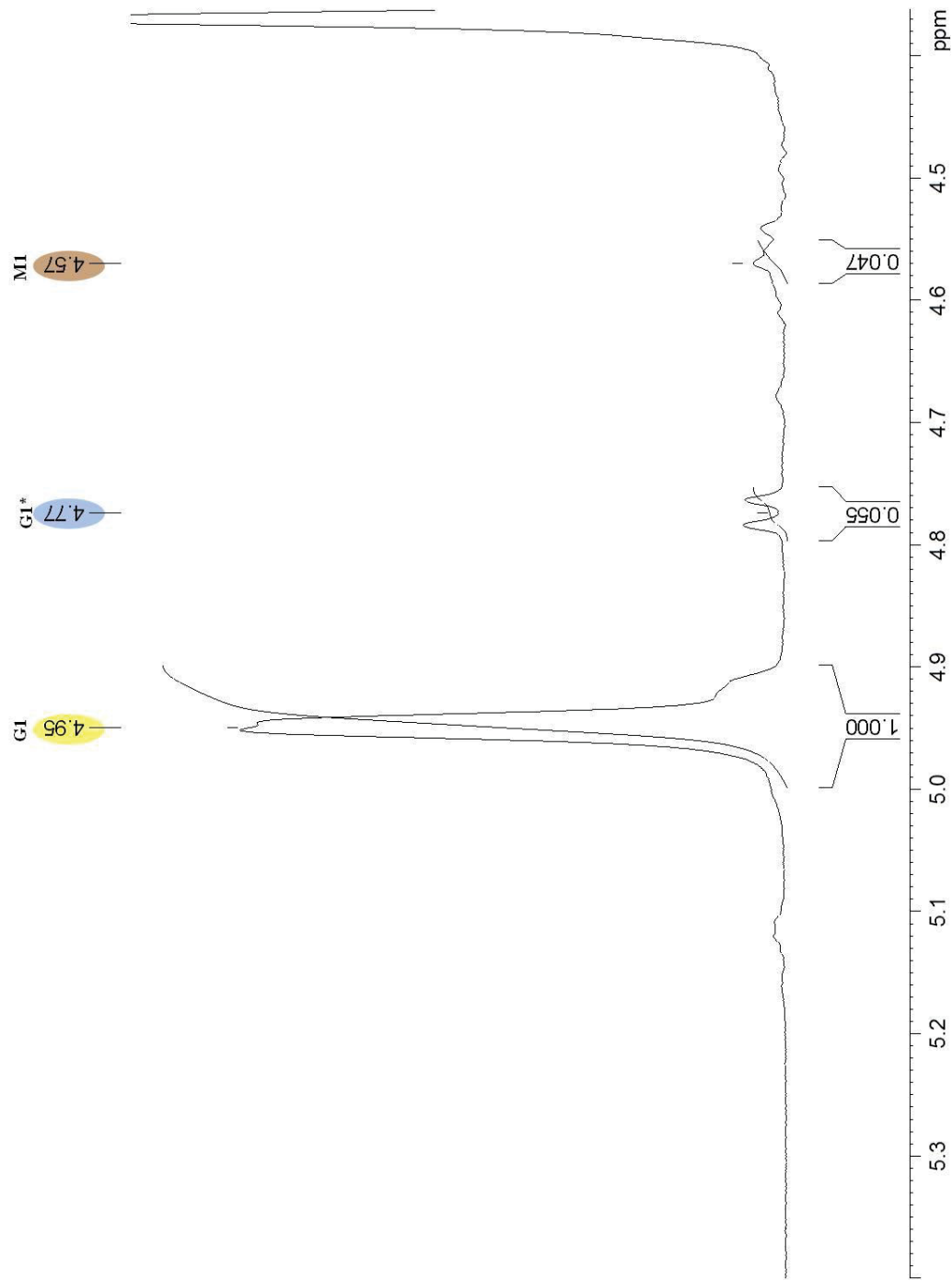
FIGURA 71 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO FI. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5)



Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,10). G-1 – G-5, G-1* e M-1 representam os C/H das unidades de α -L-GulAp (1 \rightarrow 4), α -L-GulAp terminal redutor e β -D-ManAp, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

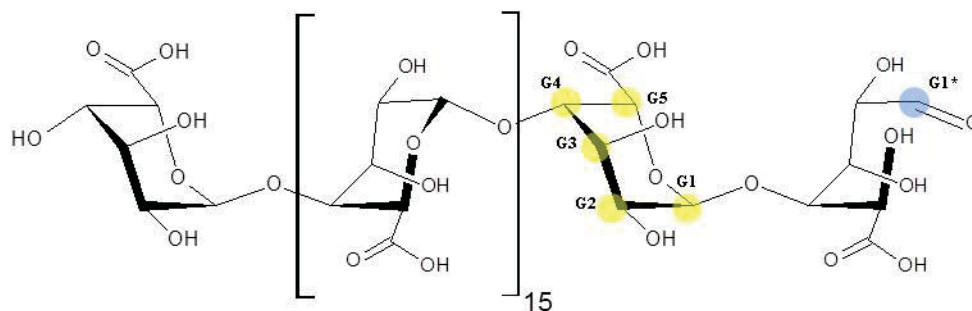
FIGURA 72 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OFI

Solvente: D_2O , 70 °C, acetona como padrão interno (31,45). G1-G6, G1* e M1 representam os C/H das unidades de α -L-GulAp 4-ligadas, α -L-GulAp terminal redutor e β -D-ManAp 4-ligadas, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 73 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO FI

Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (2,10). G1, G1* e M1 representam os hidrogênios das unidades de $\alpha\text{-L-GulAp}$ 4-ligada, $\alpha\text{-L-GulAp}$ terminal redutor e $\beta\text{-D-ManAp}$ 4-ligada, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 74 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO BLOCO BG



G1-G5 e G1* representam os C/H das unidades de α -L-GulAp (1 \rightarrow 4) e α -L-GulAp terminal redutor, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

Considerando os resultados de RMN dos blocos BM e BG foi possível determinar que estes foram isolados com graus de pureza de 81% e 96%, respectivamente. HAUG, LARSEN e SMIDSRØD (1967), obtiveram bloco BM com 85 % de pureza e o bloco BG com 90%. DUARTE, GORIN e DUARTE (1990), obtiveram blocos BM e BG com grau de pureza, 92% e mais de 98%, respectivamente. Deste modo os blocos BM e BG foram obtidos no presente trabalho com graus de pureza similar aos descritos na literatura.

Os assinalamentos de RMN das unidades majoritárias dos blocos BM e BG estão apresentados na TABELA 18.

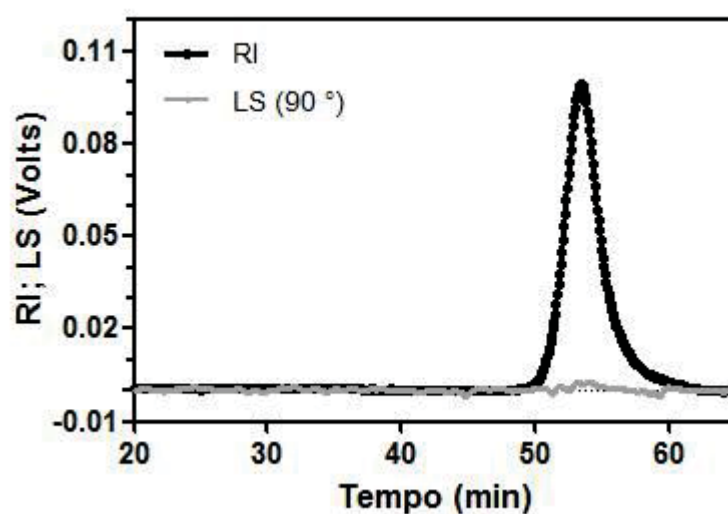
TABELA 18 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DOS BLOCOS BM E BG

Unidade	Blocos	^{13}C	^1H
[\rightarrow 4)- β -D-ManAp-(1 \rightarrow)]	BM	1	101,3
		2	71,3
		3	72,7
		4	79,4
		5	77,4
		6	176,0
[\rightarrow 4)- α -L-GulAp-(1 \rightarrow)]	BG	1	102,1
		2	66,4
		3	70,4
		4	81,1
		5	68,5
		6	175,9

FONTE: O autor (2018).

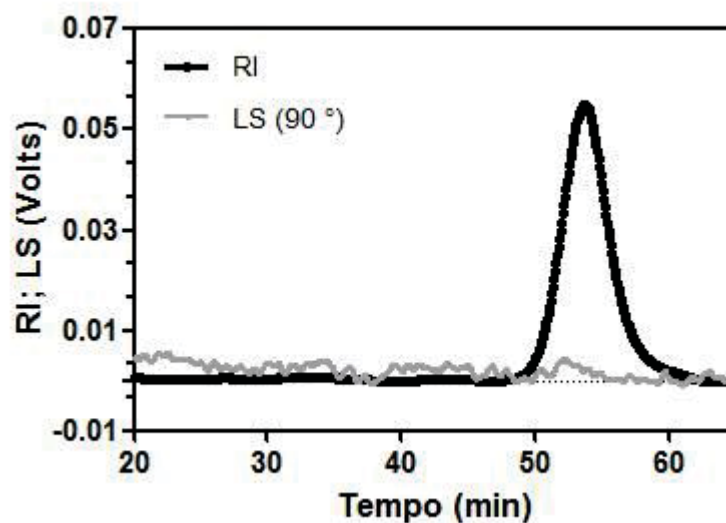
As FIGURAS 75 e 76 demonstram os cromatogramas em HPSEC-MALLS-RI dos blocos BM e BG, respectivamente. O perfil de eluição usando índice de refração (RI) como detector do bloco BM mostrou-se simétrico, com tempo de retenção de 53,25 e 53,5 minutos, respectivamente. Entretanto as duas frações não apresentaram espalhamento de luz significativo, para que pudessem ter suas massas molares ponderais médias estimadas através do espalhamento de luz. Sobrepondo os cromatogramas de HPSEC do polissacarídeo nativo (Alg-Na) e seus blocos BM e BG (FIGURA 77), fica evidenciado o aumento do tempo de retenção para os blocos, quando comparado ao alginato de sódio. Este aumento é decorrente da despolimerização parcial durante o processo de hidrólise, originando os oligossacarídeos (blocos BM e BG). Desta forma a massa molar ponderal média (M_w) estimada foi calculada através da curva padrão com dextranas. O bloco BM apresentou M_w de $1,2 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ e bloco BG $1,1 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$.

FIGURA 75 – HPSEC-MALLS-RI DO BLOCO BM



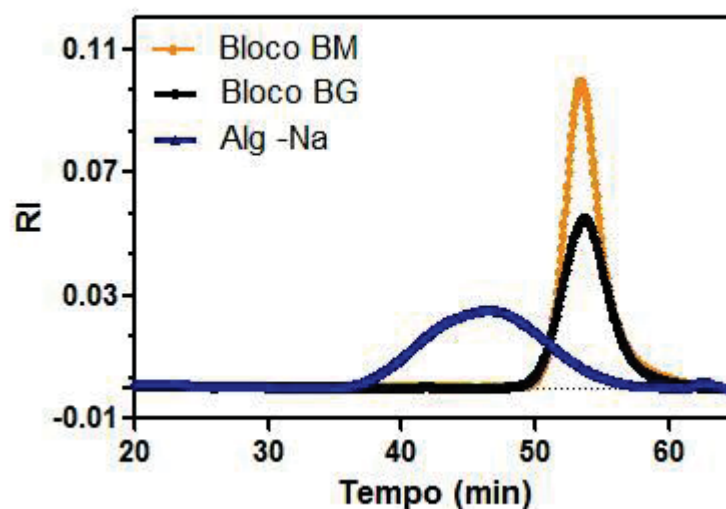
RI: *refractive index*; LS: *Laser-light scattering*. FONTE: O autor(2018).

FIGURA 76 – HPSEC-MALLS-RI DO BLOCO BG



RI: *refractive index*; LS: *Laser-light scattering* FONTE: O autor (2018).

FIGURA 77 – HPSEC DO ALGINATO DE SÓDIO E DOS BLOCOS BM E BG



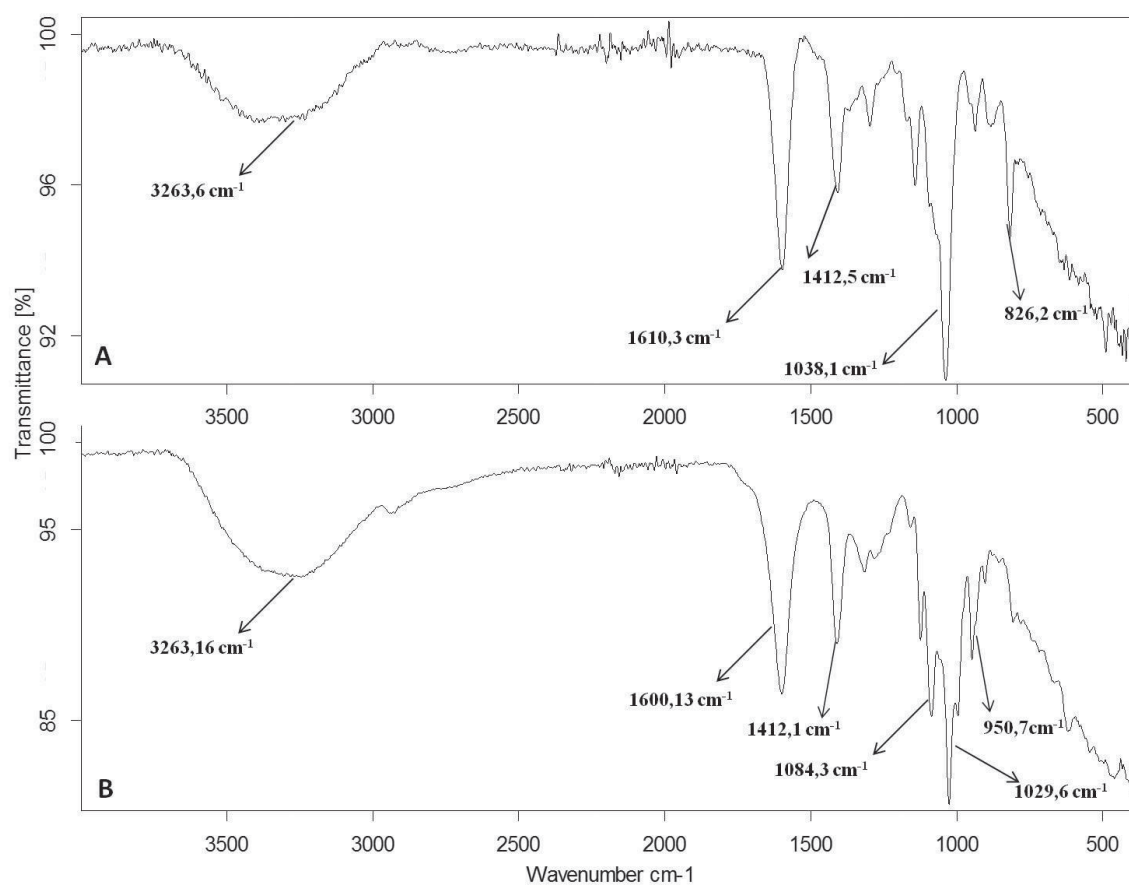
RI: *refractive index*. FONTE: O autor (2018).

A FIGURA 78 (A e B) apresenta os espectros de infravermelho do bloco BM e bloco BG, respectivamente. Além das bandas presentes, já citadas na caracterização de FT-IR do alginato de sódio, estes dois espectros se diferenciam com relação a duas bandas. No espectro do bloco BM, há a presença da banda em $826,2\text{ cm}^{-1}$ (característica do ácido manurônico), e ausência da banda em $950,7\text{ cm}^{-1}$ (C1-H deformação vibracional do ácido α -L-gulurônico), enquanto que no espectro do bloco BG ocorre o inverso, ausência da banda em $826,2\text{ cm}^{-1}$ e

presença da banda em $950,7\text{ cm}^{-1}$ (TUL'CHINSKY et al., 1976; CHEJARA et al., 2013; LEAL et al., 2008).

Pela análise dos espectros de FT-IR, os blocos BM e BG se mostraram puros, entretanto a partir da análise dos espectros de RMN, os mesmos não se apresentam como blocos homopoliméricos puros. Destaca-se que a análise de RMN é necessária a fim de determinar a identidade dos monossacarídeos presentes na fração.

FIGURA 78 – ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DO BLOCO BM (A) BLOCO BG (B)



Wavenumber: número de onda; Transmittance: transmitância. FONTE: O autor (2018).

Em conclusão foi possível obter os blocos homopoliméricos com bons rendimentos e com alto grau de pureza. Os blocos BM e BG juntamente com o alginato de sódio, foram utilizados para produção de polissacarídeos híbridos por meio de semissíntese, com o dissacarídeo carrabiose 4²-sulfato como descrito a seguir.

4.2.3 Conversão das carboxilas do alginato e seus derivados em amidas

No presente trabalho a otimização da reação de amidação dos grupos carboxilas do alginato de sódio foi realizada utilizando diferentes derivados de carbodiimidas. As reações de carbodiimidas com ácidos carboxílicos são particularmente interessantes e têm sido amplamente estudadas nas últimas décadas. Carbodiimidas solúveis em meio aquoso são utilizadas para acoplar grupos carboxílicos com moléculas contendo aminas primárias ou secundárias, produzindo amidas (CHHATBAR et al., 2012; COLODI, 2017; KRAUS; LIU, 1995; KUNIOKA; FURUSAWA, 1997; ROWLEY; MOONEY, 2002; TAUBNER; MAROUNEK; SYNITSYA, 2017).

No presente trabalho foram estabelecidas novas condições para a amidação do alginato de sódio (Alg-Na)(TABELA 20), com exceção das entradas A07 e A10 as quais foram realizadas como descritas por PARK e colaboradores (2017) e CHHATBAR e colaboradores (2012), respectivamente.

Desta forma, o alginato de sódio (Alg-Na) foi submetido a diversas reações de amidação utilizando diferentes condições. Foram variados os pHs reacionais (4,27; 6,5 e 9,5), o tampão utilizado (MES e carbonato/bicarbonato de sódio), a carbodiimida (EDC ou CMC), como também as razões molares de carbodiimida : NHS, carbodiimida : carboxila (COO^-), além da razão molar de carboxila (COO^-) : 1,3-propanodiamina (DAP). Foram mantidas fixas as condições de temperatura reacional (30 °C), concentração do polissacarídeo em solução (1% m/v), concentração do tampão (0,2 mol.L⁻¹) e tempo de reação (24 h). As diferentes condições utilizadas tiveram como objetivo otimizar a modificação das carboxilas deste poliurônico.

As reações de amidação foram avaliadas quanto a formação de produto (amida) e subprodutos (*N*-aciluréia e *O*-acilisouréia) com o auxílio de análises de RMN de ¹H.

Para os cálculos estequiométricos das reações, foi considerado que 1 mol do alginato de sódio equivale ao somatório de duas unidades de ácido urônico (ácido α -L-gulurônico e ácido β -D-manurônico) na forma sódica (397,0 g.mol⁻¹).

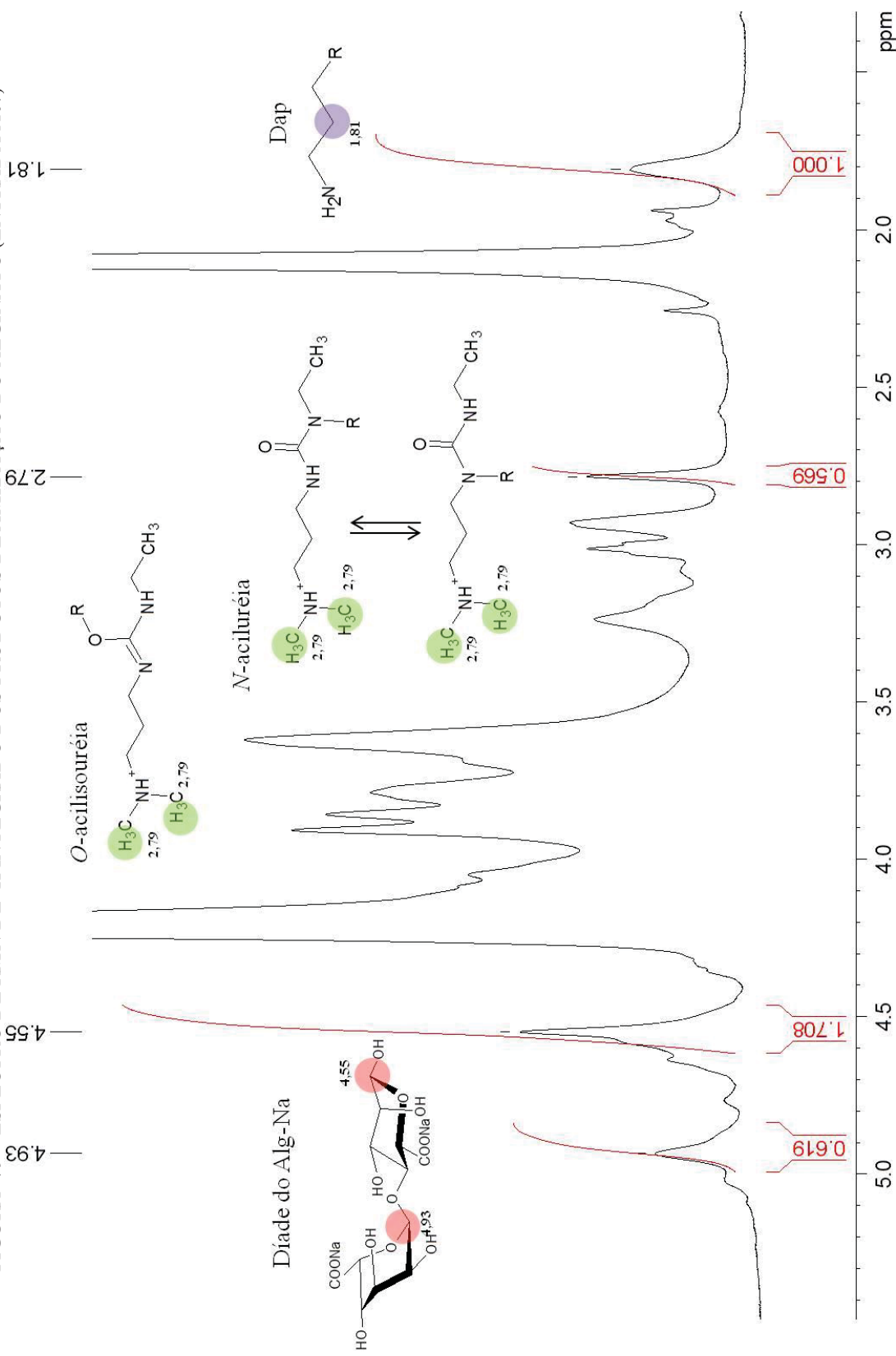
Os valores referentes a 1 mol de cada reagente utilizado nestas reações de otimização estão apresentados no TABELA 19.

TABELA 19 – VALORES DE MASSA MOLECULAR DOS REAGENTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE OTIMIZAÇÃO DE AMIDAÇÃO VIA CARBODIIMIDA

Composto	g. mol ⁻¹
Alg-Na	397,0
EDC	191,7
CMC	423,6
NHS	115,1
DAP	74,12

FONTE: O autor (2018).

A FIGURA 79 mostra como exemplo o espectro de RMN de ¹H do produto da reação de amidação do alginato de sódio conduzida conforme a entrada A07 (TABELA 20). Os sinais integrados que foram utilizados para o cálculo de formação de produtos (amida) e subprodutos da amidação (*N*-aciluréia e *O*-acilisouréia). O sinal em 1,81 ppm é referente ao C2' da 1,3-propanodiamina no produto da reação (R-CONHCH₂CH₂CH₂NH₂). Já o sinal em 2,79 ppm é atribuído aos 2 grupos metílicos da *N*-aciluréia e *O*-acilisouréia (R-NH⁺(CH₃)₂) (COLODI, 2017; INOUE; NAGASAWA, 1982). Os dois sinais anoméricos em 4,90 e 4,55 são respectivamente das unidades de α-L-GulAp e β-D-ManAp.

FIGURA 79 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H INTEGRADO DOS PRODUTOS DE AMIDAÇÃO DO ALGINATO (ENTRADA A07)

Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (2,10 ppm). R: unidades de α -L-GulAp ou β -D-ManAp e Dap: 1,3-propanodiamina. FONTE: O autor (2018).

A fim de se determinar a relação de produto (P):subproduto (SP) formado nas reações, foi realizada uma relação entre a área de integração do sinal 1,81 e 2,79 ppm, divididas pelo número de hidrogênios respectivo de cada sinal. Além disto, foi considerado para o cálculo que a área referente a DAP consiste em 1 unidade amidada, e que o somatório das áreas dos H anoméricos correspondem a 100% do polissacarídeo.

Considerando:

- 1 CH_2 da Dap - $1,000/2 \text{ H} \rightarrow 0,500$
- 2 CH_3 da N-aciluréia e O-acilisouréia - $0,569/6\text{H} \rightarrow 0,095$
- 2 CH anoméricos da díade do Alg-Na - $1,709 + 0,619 \rightarrow 2,328$

A relação de P:SP é dado por:

$$\text{Subproduto} = \frac{0,095 \times 1 \text{ unidade amidada}}{0,500} = 0,2 \text{ unidades de subprodutos}$$

O percentual total de subproduto no polissacarídeo é dado por:

$$\text{Subproduto \%} = \frac{0,095 \times 100 \%}{2,328} = 4,1 \%$$

O percentual total de amidação no polissacarídeo é dado por:

$$\text{Amidação \%} = \frac{0,500 \times 100 \%}{2,328} = 21,5 \%$$

O percentual total de modificação no polissacarídeo:

$$\text{Modificação total} = (4,1 + 21,5) = 25,6 \%$$

Desta maneira, na reação de amidação (entrada A07), a cada 1 unidade amidada com a DAP estão presentes 0,2 unidades de subproduto, na forma de N-aciluréia ou O-acilisouréia. No polissacarídeo (Alg-Na), onde 100% das carboxilas podem sofrer a reação de amidação, 21,5% estão amidadas com a DAP e 4,1% produziram subprodutos, resultando em 25,6% de modificação total do polissacarídeo.

Na TABELA 20 estão apresentadas as condições reacionais utilizadas no processo de otimização da amidação via carbodiimida do alginato de sódio (entrada A01 até A10). Juntamente com os percentuais totais de: amidação, subprodutos e modificação do polissacarídeo, bem como a relação de P:SP (cálculos já demonstrados).

TABELA 20 – REAÇÕES DE OTIMIZAÇÃO DA AMIDAÇÃO VIA CARBODIIMIDA DO ALGINATO DE SÓDIO

Entrada	Alg-Na mmol	DAP mmol	CMC mmol	EDC mmol	NHS mmol	Carbodiimida: NHS	pH	Rend (%)	Amidação ^a (%)	Subprodutos ^b (%)	P : SP ^c	Modificação total (%)
A01	0,25	5,0	-	0,5	0,25	2:1	9,5	94	0	0	0	0
A02	0,25	5,0	0,75	-	1,5	3:6	6,5	90,6	0	0	0	0
A03	0,25	5,0	-	0,75	1,5	3:6	6,5	94	7	2,1	1 : 0,3	9,1
A04	0,25	5,0	0,75	-	1,5	3:6	4,27	91,2	2,6	0	1 : 0	2,6
A05	0,25	5,0	-	0,75	1,5	3:6	4,27	69,6	13	0	1 : 0	13
A06	0,25	5,0	0,5	-	0,25	2:1	6,5	98,1	11,3	0	1 : 0	11,3
A07	0,25	5,0	-	0,5	0,25	2:1	6,5	87,6	21,5	4,1	1 : 0,2	25,6
A08	0,25	5,0	0,5	-	0,25	2:1	4,27	99,7	9,6	0	1 : 0	9,6
A09	0,25	5,0	-	0,5	0,25	2:1	4,27	80,4	10,6	1,1	1 : 0,1	11,7
A10	0,25	0,4	-	1,0	0,62	4,12:2,5	6,0	99,0	15	3	1 : 0,2	18

^a percentual de amidação (P); ^b percentual de subprodutos (SP) (*O*-acilisouréia e N-aciluréia); ^c relação entre produto e subproduto (P:SP) formado. FONTE: O autor (2018).

Na entrada A01, a reação foi realizada em tampão carbonato-bicarbonato de sódio em pH 9,5, em presença de 20 mmols da DAP, 2 mmol de EDC e 1 mmol de NHS. O pH 9,5 está na faixa dos pKas da diamina utilizada, 8,88 e 10,55 (PERRIN, DEMPSEY e SERJEANT; 1981). Nesta entrada A01 não foram observados a formação tanto do produto amida, como dos subprodutos (*N*-aciluréia e *O*-acilisouréia), apresentando o espectro de RMN de ^1H similar ao da fração Alg-Na nativa.

O insucesso da reação A01 é devido principalmente ao pH alcalino do meio. As reações de amidação envolvem duas etapas: a carboxila é ativada por meio da carbodiimida, formando o intermediário *O*-acil, que em seguida sofre o ataque nucleofílico pela amina, levando a formação da ligação amida. No entanto, estas duas etapas de reação são fortemente dependentes do pH, além de apresentarem diferentes faixas de pH para cada etapa. A primeira etapa apresenta melhores rendimentos quando realizada em um ambiente químico ácido, apresentando um pH entre 3,5 – 4,5 (NAKAJIMA; IKADA, 1995), enquanto a formação da amida apresentam melhores resultados em altos pH, quando a amina está desprotonada. Entretanto em altos pH, o intermediário *O*-acilisouréia é rapidamente rearranjado no subproduto *N*-aciluréia, impedindo que ocorra o ataque nucleofílico da amina à carboxila (INOUE; NAGASAWA, 1982; SCHANTÉ et al., 2011).

A fim de se realizar reações utilizando o tampão MES, no pH 4,27, próximo a faixa de pH (3,5 – 4,5) ótima para a primeira etapa da reação, a ativação da carboxila, foi realizada a entrada A09, em presença de 20 mmols da DAP, 2 mmols de EDC, 1 mmol de NHS, a pH 4,27, resultando tanto na formação de amida (10,6%), como também de subprodutos (1,1%). Comprovando que o pH mais ácido é realmente mais favorável a reação de amidação, como reportado por NAKAJIMA e IKADA (1995).

Na tentativa de diminuir a formação de subproduto, foi realizada a entrada A05, semelhante a entrada A09, entretanto fazendo uso de excesso de NHS com relação a carbodiimida EDC (6 mmols de NHS e 3 mmols de EDC). Destacando-se que o uso de *N*-hidroxissuccinimida (NHS) em conjunto com a EDC, tende a formar intermediários mais resistentes a hidrólise e que não sofram rearranjos, levando a maiores graus de substituição (BULPITT, AESCHLIMANN; 1999). Desta forma, o aumento da quantidade de NHS em relação a quantidade de EDC, gerou um aumento no percentual de formação de amida na entrada A05 (13%) com relação a entrada A09 (10,6) neste pH 4,27, além de não ser observado a formação de subprodutos (*N*-aciluréia e *O*-acilisouréia) na entrada A05.

Outra estratégia na tentativa de melhorar os rendimentos de amidação foi a troca da carbodiimida EDC pela CMC, uma carbodiimida solúvel em meio aquoso utilizada nos

processos de reticulações de grupos carboxílicos com grupos amino (AHN et al., 2013). Foram realizadas duas reações utilizando a carbodiimida CMC, entradas A04 e A08. Além disto, estas duas reações foram conduzidas variando a proporção de carbodiimida:NHS (3:6 e 2:1, respectivamente). Como resposta da troca da carbodiimida EDC pela CMC, foi observada a formação de 2,6 e 9,6% de amidação em A04 e A08, respectivamente. Apesar de não serem relatados na literatura a formação de subprodutos durante a reação de amidação com CMC, estas carbodiimidas apresentam um maior impedimento estérico, devido à presença de grupos laterais mais volumosos (ciclohexil e 2-morfoninoetil) em sua estrutura, sendo necessário tempos de reação mais longos (AHN et al., 2013).

A fim de se comparar os percentuais de amidação em um pH que fosse mais favorável ao ataque nucleofílico da diamina (pH mais básico), em presença do intermediário derivado do NHS, que permite melhores rendimentos de acoplamento de aminas em pH neutro ou levemente básico (pH 7,0 – 8,5) (BULPITT, AESCHLIMANN; 1999), foram realizadas reações em pH 6,5. Além disto, foram variadas tanto a proporção de carbodiimida:NHS (3:6 e 2:1), bem como a carbodiimida (EDC e CMC).

Comparando primeiramente as entradas as quais foram conduzidas fazendo uso da proporção 3:6 e 2:1 de EDC:NHS, para A03 e A07, respectivamente, foi observado uma maior formação de amida na entrada A07 (21,5%), a qual fez uso de menor excesso de NHS, quando comparada a formação de amida da entrada A03 (7%), que utilizou o dobro de excesso de NHS com relação a carbodiimida. Apesar do aumento do percentual de amida, também foram observado o aumento na formação de subprodutos, 4,1 e 2,1% nas entradas A07 e A03, respectivamente.

Devido ao aumento de amidação com a elevação do pH, tornando-se mais favorável a formação de produto, foram realizadas as entradas A02 e A06, fazendo uso das mesmas variáveis que as entradas A03 e A07, entretanto foi utilizada a carbodiimida CMC para a qual não existem relatos sobre a formação de subprodutos. Como resposta desta variação de carbodiimida bem como a sua proporção com relação ao NHS, obteve-se ausência ou baixas percentuais na formação de amida. Na entrada A02 a qual foi conduzida com a proporção de 3:6 de CMC:NHS, não foi verificado a formação de amida, enquanto a entrada A06 que utilizou uma menor proporção (2:1), apresentou 11,3% de amida. Desta forma, pode-se supor que a utilização da carbodiimida CMC em processos de amidação, gera maiores percentuais de produto em pH mais ácido, quando comparado a pH neutro, entretanto não é mais eficiente que a carbodiimida EDC na formação de produto.

Além destas reações as quais fazem uso de grande quantidade de excesso do nucleófilo amina (DAP), cerca de 20 vezes a quantidade de carboxilas, foi realizada a entrada A10, a qual utilizou 0,5 mmol de excesso da diamina. Além disto a entrada A10 foi conduzida utilizando a carbodiimida EDC, pH 6,0, com excesso de EDC com relação ao NHS (4,12:2,5). Esta reação apresentou a formação de 15% de amida e 3% de subprodutos.

Adicionalmente, o intuito da otimização da reação de amidação, era conseguir produzir a maior quantidade de amida, com uma reduzida taxa de subprodutos. Entretanto, foi obtido um baixo rendimento de amidação (0 – 21,5%), quando comparamos com os dados da literatura.

CHHATBAR e colaboradores (2012), produziram através de reações de amidação via carbodiimida, alginatos de sódio acoplados ao ácido 4-aminobenzóico, com até 74,0% de ligações amida. Similar grau de modificação (71,4%) do alginato de sódio foi obtido com o uso da 1-aminonaftaleno (CHEJARA et al., 2013).

Esta diferença no grau de amidação reportada na literatura e do presente trabalho, pode ser explicada a partir do pKa das aminas utilizadas, uma vez que estas aminas (DAP, ácido 4-aminobenzóico e 1-aminonaftaleno) apresentam pKas diferentes. A DAP apresenta altos valores de pKa (10,55 e 8,88) quando comparados ao ácido 4-aminobenzóico (pKa 4,9) e ao 1-aminonaftaleno (pKa 3,92). Em pH 6,5 as duas aminas (4-aminobenzóico e 1-aminonaftaleno) estão totalmente desprotonadas, sendo bons nucleófilos a este pH, diferentemente da DAP, que nos pH testados (4,27 e 6,5) se apresentam totalmente protonadas. Desta forma o grau de derivatização dos ácidos urônicos através de reações de amidação via carbodiimida, apresentam uma forte dependência da natureza do nucleófilo utilizado à substituição (BULPITT, AESCHLIMANN; 1999).

Assim, a entrada A07 foi selecionada como a condição reacional para a produção por semissíntese de híbridos constituídos por alginato de sódio ou seus produtos de hidrólise (BM e BG) com o dissacarídeo *carrabiose* 4²-sulfato obtido da *kappa*-carragenana.

4.2.4 Síntese de Alg-Dap

Uma reação em maior escala de amidação do alginato de sódio foi realizada conforme a condição A07, com 1,3-propanodiamina (DAP), resultando na fração Alg-Dap, com um rendimento de recuperação de 81,4%.

Através da análise de RMN de HSQC da fração Alg-Dap, foi possível assinalar os C/H anoméricos das unidades de α -L-GulAp e β -D-ManAp constituintes dos blocos BG e BM,

em 100,8/4,93 e 101,1/4,55 ppm, respectivamente, como demonstrado na FIGURA 80 (A). Na FIGURA 80 (B), os sinais em 66,4/3,78, 71,2/3,91, 81,0/4,02 e 68,4/4,34 ppm, foram atribuídos aos C2/H2, C3/H3, C4/H4 e C5/H5 das unidades de α -L-GulAp ligados (1 \rightarrow 4), e as correlações em 71,2/3,91, 72,6/3,61, 79,2/3,78 e 77,0/3,63 ppm, correspondem aos C2/H2, C3/H3, C4/H4 e C5/H5 das unidades de β -D-ManAp ligados (1 \rightarrow 4), respectivamente.

O espectro de RMN de HSQC mostrou novos sinais, com relação ao espectro de RMN de HQSC da fração Alg-Na, em 37,3/3,24, 38,5/2,93 e 27,8/1,80 ppm, as quais foram atribuídas aos C/H da 1,3-propanodiamina ligada. A correlação em 37,3/3,24 ppm corresponde ao C1'/H1' (CONHCH₂CH₂CH₂NH₂) do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida, e as correlações em 38,5/2,93 e 27,8/1,80 ppm foram atribuídas ao C3'/H3' (CONHCH₂CH₂CH₂NH₂) e C2'/H2' (CONHCH₂CH₂CH₂NH₂) do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida, respectivamente (CHHATBAR et al., 2011). Estes assinalamentos foram confirmados pela análise de RMN homonuclear ¹H/¹H de COSY (ANEXO 2, pg. 327), onde tanto o próton 3,24 ppm como 2,93 ppm correlacionam com o próton 1,80 ppm.

Além disto, é possível corroborar este assinalamento do próton H1' (3,24 ppm), com o reportado por PARK e colaboradores (2017). Através da mesma reação de amidação via EDC/NHS, PARK e colaboradores amidaram as carboxilas do ácido hialurônico com a 1,2-etilenodiamina, e atribuíram o sinal em 3,2 ppm aos hidrogênios metilênicos de C1' (CONHCH₂CH₂NH₂) da amida, o que está de acordo com o assinalamento realizado para o grupo *N*-(3-aminopropil)-amida, na fração Alg-Dap.

No ANEXO 3 (pg.327) está apresentado o espectro de RMN de HSQC da 1,3-propanodiamina livre em pH 7, podendo ser observado apenas duas correlações em 37,7/3,01 e 25,7/1,96 ppm atribuídas aos C1' e C3' e ao C2', respectivamente, evidenciando a diferença de deslocamento químico que os prótons apresentam quando a 1,3-propanodiamina está livre, e quando apresenta uma das extremidades ligada covalentemente a carboxila, formando uma ligação amida.

Além das correlações referentes ao grupo *N*-(3-aminopropil)-amida foram observadas outras correlações atribuídas ao intermediário *O*-acilisouréia e ao subproduto *N*-aciluréia (FIGURA 81 C). O deslocamento químico em 44,2/2,78 ppm foi atribuído aos grupos metílicos (NH⁺(CH₃)₂) tanto do intermediário como do subproduto. As correlações em 56,4/3,06, 24,7/1,94 e 14,6/1,07 ppm também foram atribuídas ao intermediário *O*-acilisouréia e subproduto *N*-aciluréia (COLODI, 2017; INOUE; NAGASAWA, 1982).

O espectro de RMN de HSQC da fração Alg-Dap não apresentou deslocamentos químicos dos C5/H5 e C4/H4 após a formação da (*N*-(3-aminopropil)-amida-alginato. Na

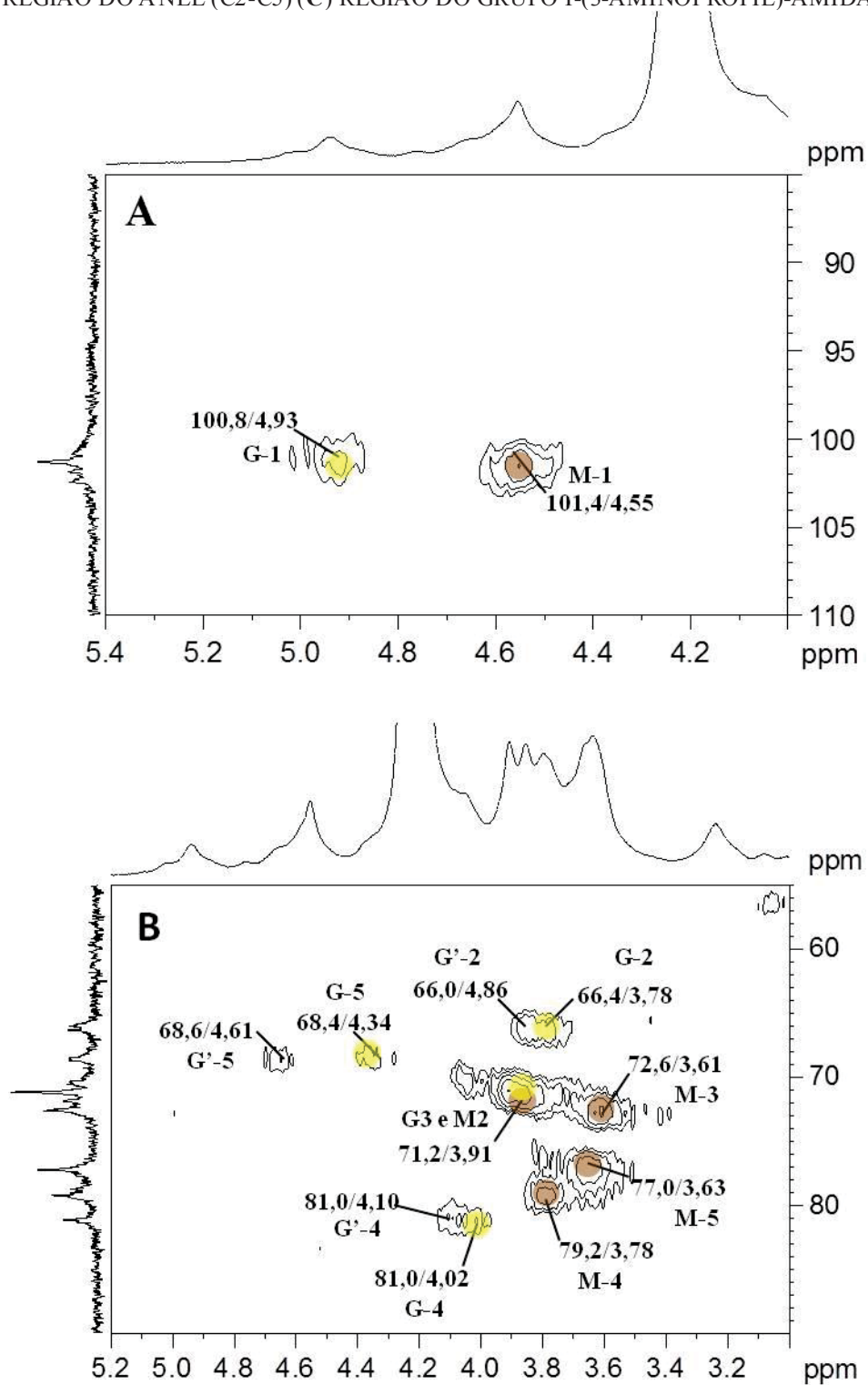
literatura é reportado, que a amidação do alginato de sódio com a 1,2-etilenodiamina provoca um deslocamento químico em todos C/H da unidade amidada (CHEJARA et al., 2013; CHHATBAR et al., 2011; CHHATBAR et al., 2012). Entretanto, segundo CHHATBAR e colaboradores, este deslocamento químico é mais pronunciado na posição C4/H4 das unidades de β -D-ManAp, de 79,3/3,68 ppm na fração nativa de alginato, para 72,3/3,69 ppm para o alginato amidado (efeito beta de -7,04/-0,01 ppm).

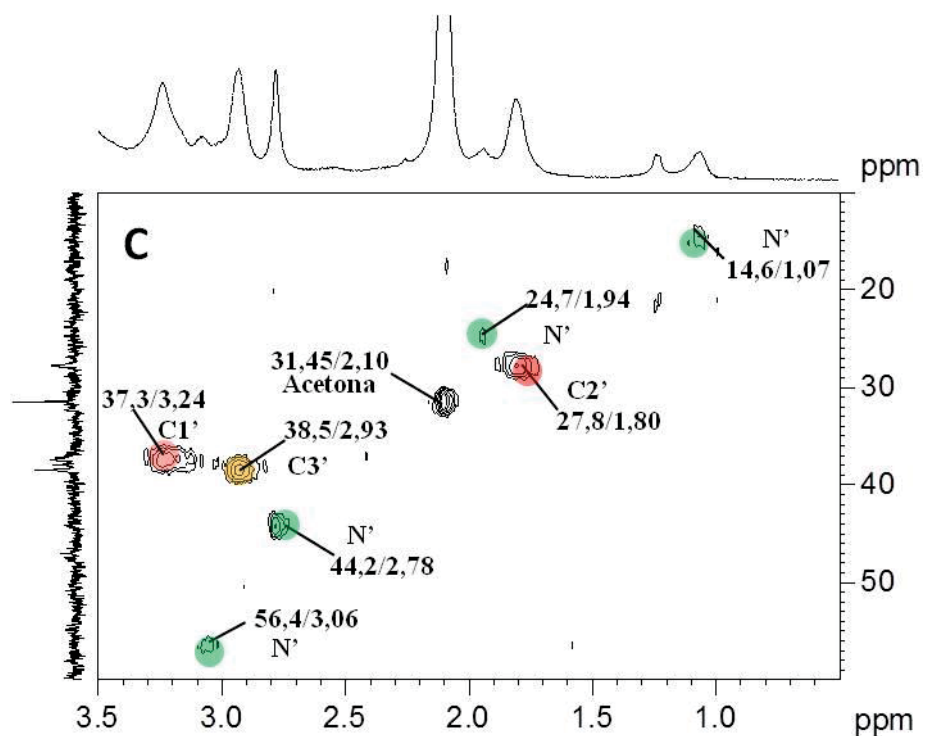
Através do espectro de RMN de ^{13}C da fração Alg-Dap (FIGURA 81) não foi possível identificar os sinais referentes as carbonilas do α -L-GulAp e β -D-ManAp sem modificações devido a grande quantidade de sinais na região entre 176,1 - 175,6 ppm. Além disto, foram observados 4 novos sinais (comparando com o espectro de RMN de ^{13}C da fração nativa Alg-Na) na região das carbonilas, em 174,9, 173,2, 172,7 e 169,6 ppm, entretanto não foi possível identificar pelo espectro de RMN de HMBC quais sinais correspondem as carbonilas amidadas das unidades de α -L-GulAp e do β -D-ManAp.

CHHATBAR e colaboradores (2011), realizaram reações de amidação no alginato de sódio, utilizando diferentes diaminas. Ao realizar a amidação com a 1,6-hexadiazina, as carbonilas das unidades de α -L-GulAp e do β -D-ManAp, deslocaram de 175,3 ppm para 170,5 ppm após a amidação, e quando a amidação foi realizada com a 1,2-etilenodiamina, as carbonilas amidadas apresentaram seus sinais em 174,7 ppm. Os autores relatam não haver diferença no sinal da carbonila amidada das unidades de α -L-GulAp e β -D-ManAp, indicando que ocorre o mesmo deslocamento químico nas carbonilas amidadas. Entretanto os autores relatam que uma diamina de maior cadeia alifática, causa um maior deslocamento químico no carbono carbonílico devido a maior influência de cargas positivas, reduzindo assim a blindagem do carbono.

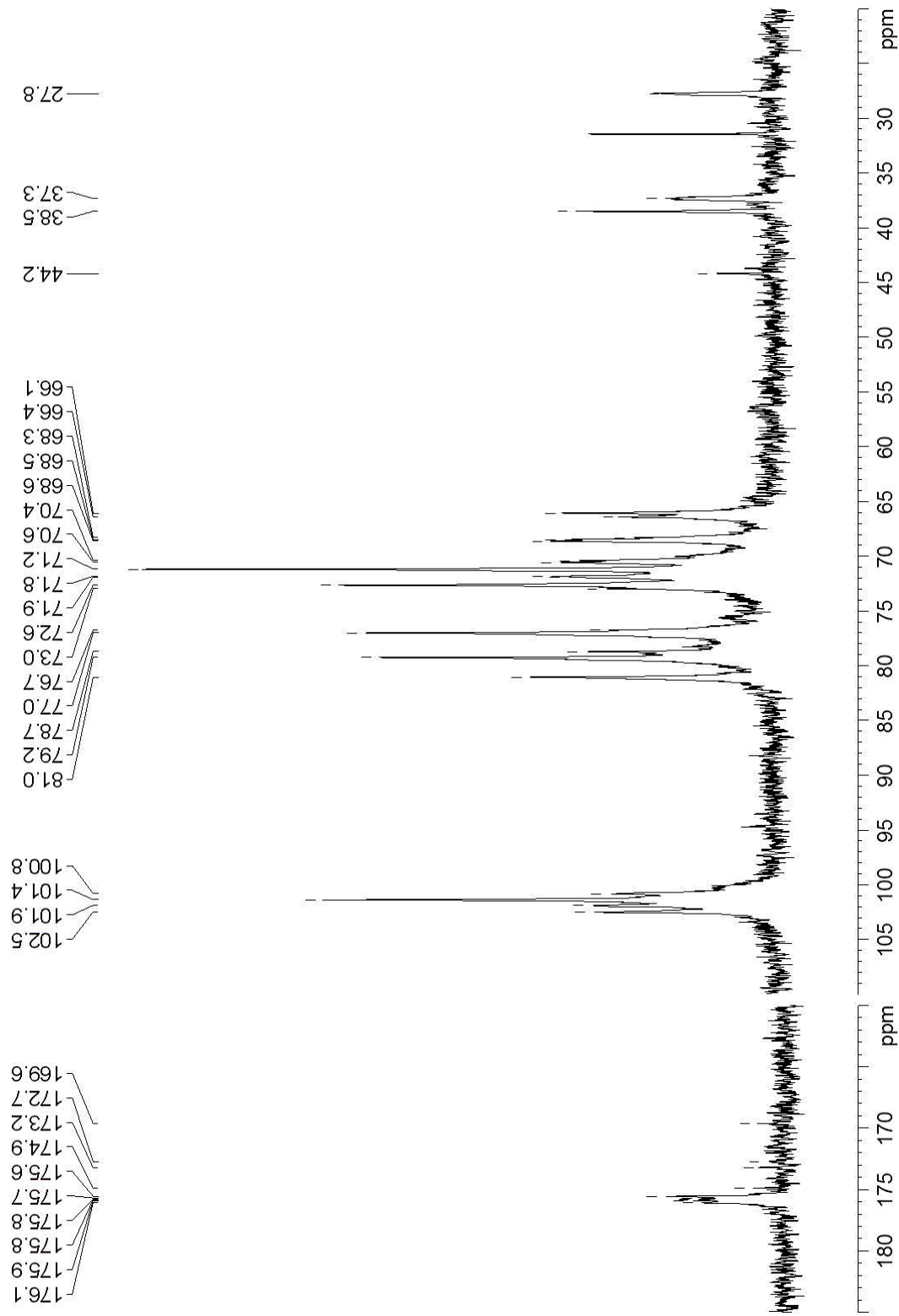
Em contrapartida, CHEJARA e colaboradores (2013) reportaram a amidação do alginato de sódio (C6 de β -D-ManAp e α -L-GulAp em 176,5 e 176,8 ppm, respectivamente) com a 1-Naftilamina. Através do espectro de RMN de ^{13}C relataram diferenças nos deslocamentos químicos das carbonilas das unidades de ácido manurônico e ácido gulurônico. Os deslocamentos de 162,8 e 179,1 ppm, após amidação foram atribuídos as unidades de β -D-ManAp e α -L-GulAp, sendo observados efeitos alfa de +2,29 e -13,7 ppm, respectivamente.

FIGURA 80 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO ALG-DAP. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO I-(3-AMINOPROPIL)-AMIDA





Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,10). G-1 – G-5, M-1 – M-5, G'-1 – G'-5 representam os C/H das unidades de α -L-GulAp e β -D-ManAp constituindo os blocos BG, BM, e BGM, respectivamente. Enquanto C1'-C3 são referentes aos C/H do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida, e N'-N representam os C/H do subproduto *N*-acilisourêia. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 81 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO ALG-DAP

Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (31,45). FONTE: O autor (2018).

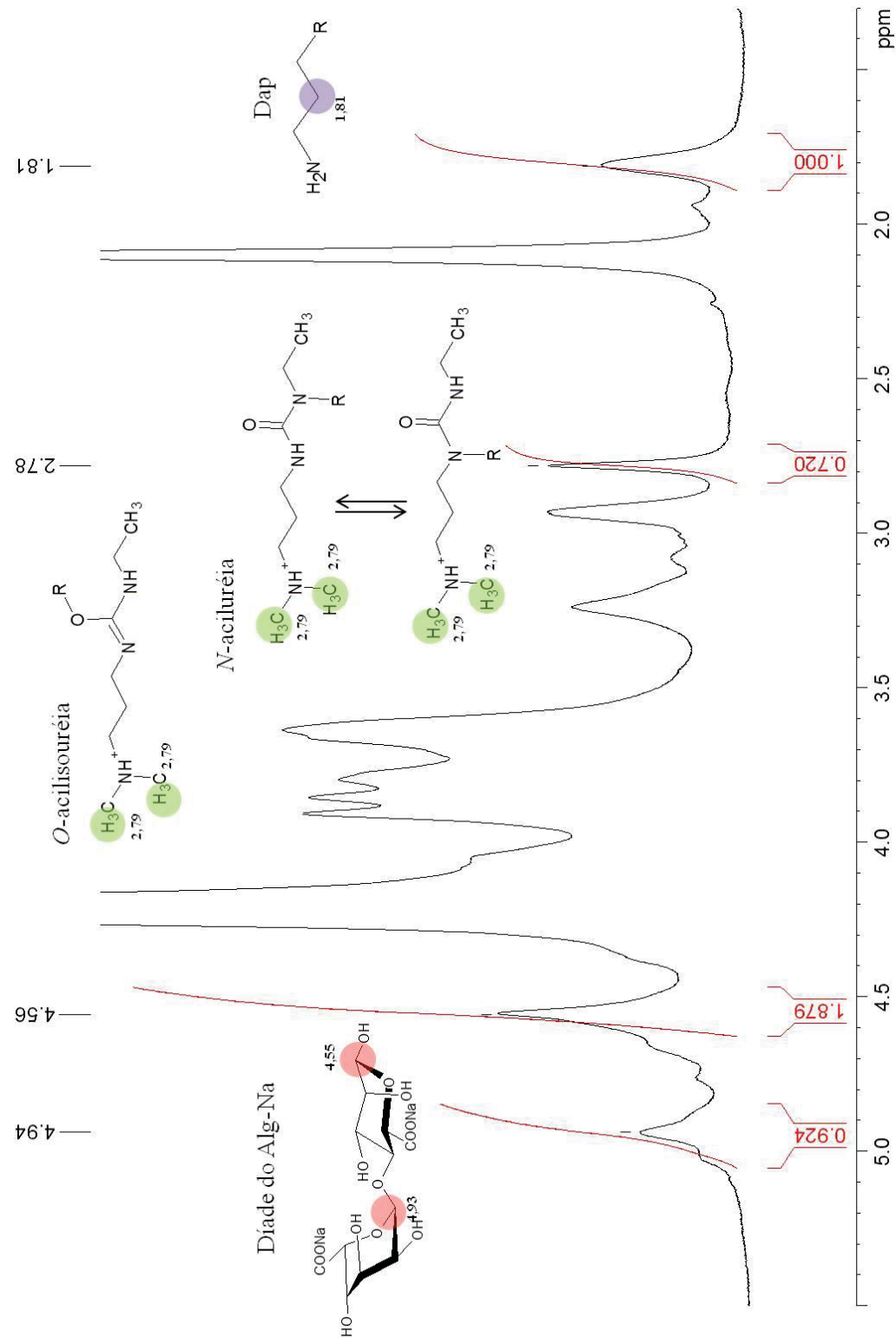
Os assinalamentos das unidades constituintes do polissacarídeo amidado Alg-Dap estão apresentados na TABELA 21.

TABELA 21 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS UNIDADES CONSTITUINTES DA FRAÇÃO ALG-DAP

Unidade	Bloco		^{13}C	^1H
[\rightarrow 4)- α -L-GulAp-(1 \rightarrow]	BG	1	100,8	4,93
		2	66,0	3,78
		3	71,3	3,91
		4	81,2	4,02
		5	68,6	4,34
		6	n.d.	-
		6 [#]	n.d.	-
[\rightarrow 4)- β -D-ManAp-(1 \rightarrow]	BM	1	101,1	4,55
		2	71,3	3,91
		3	72,6	3,61
		4	79,4	3,78
		5	77,3	3,63
		6	n.d.	-
		6 [#]	n.d.	-
[\rightarrow 4)- α -L-GulAp-(1 \rightarrow \rightarrow 4)- β -D-ManAp-(1 \rightarrow]	BGM	1'	n.d.	n.d.
		2'	66,0	4,86
		3'	n.d.	n.d.
		4'	81,2	4,10
		5'	68,8	4,61
		6'	n.d.	-
		6 [#]	n.d.	-
DAP	-	C1'	37,3	3,24
		C2'	27,8	1,80
		C3'	38,4	2,93

n.d.= Não determinado. BG, BM, BGM correspondem às unidades dos blocos homopoliméricos e heteropoliméricos, respectivamente. Enquanto os subscritos # são referentes as carbonilas C6 amidadas. DAP corresponde a 1,3-propanodiamina ligada a carbonila dos ácidos urônicos. FONTE: O autor (2018).

Através do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 82), foi estimado o teor de produto e subproduto na fração Alg-Dap. Foi determinado através do cálculo demonstrado anteriormente, que 22,1% do polissacarídeo foi modificado, sendo que 17,8% é referente ao grupo *N*-(3-aminopropil)-amida e apenas 4,3% se referem à formação da *O*-acilisouréia, e *N*-aciliuréia. Desde modo, a cada 1 unidade de *N*-(3-aminopropil)-amida formada, estão presentes 0,2 unidades de subprodutos.

FIGURA 82 – INTEGRAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO O ALG-DAP

Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (2,10 ppm). R: unidades de $\alpha\text{-L-GalNAc}$ ou $\beta\text{-D-ManA}$ e DAP: 1,3-propanodiamina. FONTE: O autor (2018).

Outra maneira de ser calcular o percentual de amidação foi descrito por TAUBNER; MAROUNEK e SYNYTSYA (2017), que realizaram reações de amidação com diferentes aminas e diaminas no alginato de sódio. As reações foram realizadas em duas etapas: inicialmente uma esterificação com metanol em presença de ácido sulfúrico, e posteriormente em meio orgânico N,N-dimetilformamida (DMF), onde ocorreu a reação de amidação com as diferentes aminas. A quantificação destas reações tiveram o auxílio da análise elementar de nitrogênio (N) e carbono (C) totais. A partir das percentagens de nitrogênio (N%) e carbono (C%), as massas moleculares do N (14 g.mol⁻¹) e do C (12 g.mol⁻¹), junto com a relação do número de átomos de carbonos e hidrogênios presentes em cada amina utilizada, os autores descreveram a seguinte equação para determinar o grau de substituição das carboxilas por aminas (DA):

$$DA = \frac{N. 12.6}{C. n. 14 - N. c. 12} \times 100 \quad (\text{TAUBNER; MAROUNEK; SYNYTSYA, 2017})$$

N e *C* – percentual de nitrogênio e carbono; *n* e *c* – número de átomos de nitrogênio e de carbono da amina.

Os autores reportaram que através deste tipo de modificação química, para sintetizar diferentes amidas de alginato, alcançaram graus de substituição que variaram entre 37,2 – 93,2 mol % (TAUBNER; MAROUNEK e SYNYTSYA 2017).

Desta forma foram realizadas análises elementares de N e C do alginato de sódio nativo, e o alginato de sódio amidado com a 1,3-propanodiamina. Fazendo uso dos resultados da análise elementar de N e C, e considerando os 2 átomos de nitrogênio e 3 átomos de carbono da 1,3-propanodiamina, foi possível determinar o grau de substituição da reação de amidação do alginato de sódio conforme a metodologia descrita por TAUBNER e colaboradores (2017), como está demonstrado na TABELA 22. A fração Alg-Dap apresentou um DA de 18,6 mol%, valor este próximo aos 22,1 mol% calculado através do grau de substituição do espectro de RMN de ¹H (FIGURA 83) da mesma fração.

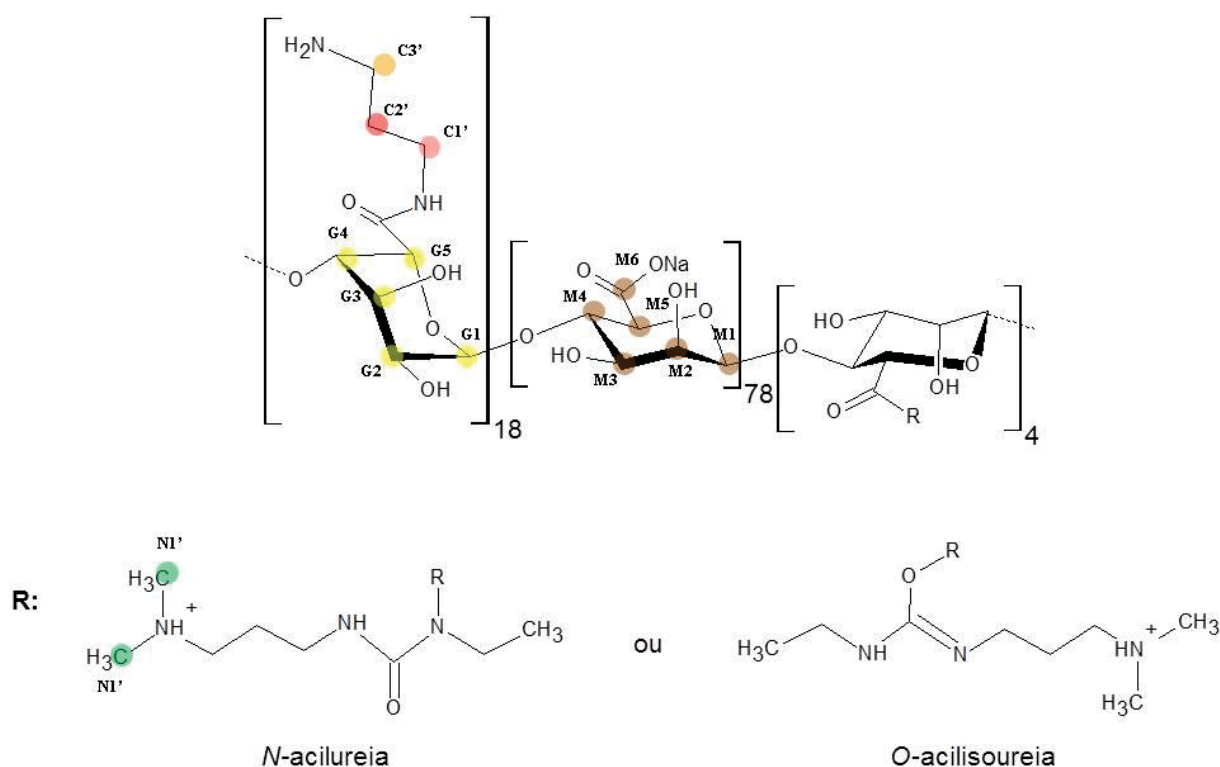
TABELA 22 – ANÁLISE ELEMENTAR DO ALGINATO DE SÓDIO E SEU DERIVADO AMIDADO (ALG-DAP)

Fração	N (%)	C (%)	DA (mol%)
Alg-Na	0,17	30,50	-
Alg-Dap	2,22	33,54	18,61

N% e C % corresponde aos percentuais de nitrogênio e carbono. DA grau de substituição de amino a cada 1 mol x 100. FONTE: O autor (2018).

A FIGURA 83 ilustra uma estrutura hipotética do alginato de sódio amidado via EDC com a propanodiamina. Podem estar presentes na estrutura do polissacarídeo, a 1,3-propanodiamina ligada via carboxila gerando uma amida, bem como carboxilas livres protonadas, além da presença do intermediário *O*-acilisouréia e do subproduto *N*-aciluréia.

FIGURA 83 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL HIPOTÉTICA DA FRAÇÃO ALG-DAP



Os símbolos são referentes a: ● N-aciluréia e O-acilisouréia; ● α -L-GulAp; ● β -D-ManAp; ●, ● e ● são referentes a N-(3-aminopropil)-amida. FONTE: O autor (2018).

Apesar de não terem sido realizadas análises quanto a viscosidade, após a liofilização e a resolubilização a quente da fração Alg-Dap, ela apresentou visivelmente um caráter mais viscoso, que a sua fração nativa (Alg-Na). Este aumento na viscosidade e formação de

hidrogéis mais fortes após reações de amidação do alginato de sódio são reportados na literatura.

CHHATABAR e colaboradores (2012), após realizarem a reação de amidação do alginato com o ácido *m*-aminobenzóico (MABA), na presença da carbodiimida EDC, observaram que o derivado amida formou um sistema de hidrogel viscoso, exibindo comportamento tixotrópico. Além disto, CHHATABAR e colaboradores (2012) relataram que o aumento da viscosidade pode ser devido à formação de estruturas helicoidais duplas mais fortes, através da participação do grupo carboxila (COOH) da MABA, na formação de pontes de hidrogênio, aumento subsequentemente o número de zonas de junção no sistema de tridimensional de rede do gel.

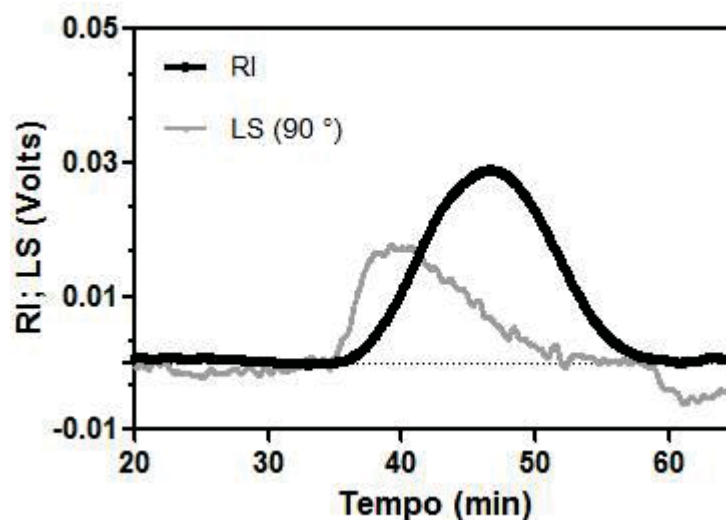
Comportamento semelhante foi obtido por CHEJARA e colaboradores (2013) após realizarem a amidação do alginato com a 1-naftilamina em presença de EDC. Além disto, o aumento na viscosidade dos derivados amidas também foi atribuído à formação das estruturas helicoidais duplas mais fortes, devido a participação de uma porção hidrofóbica do 1-naftilamina e as porções hidrofílicas (não modificadas) do alginato de sódio, aumento desta forma o número de zonas de junção na rede de gel.

Devido aos relatos na literatura, supõem-se que o aumento da viscosidade do alginato amidado com a DAP, no presente trabalho, é devido a formação espontâneas de estruturas de dupla hélice através de pontes de hidrogênio entre os grupos -OH , COO^- e a DAP.

A fração Alg-Dap foi analisada por HPSEC-MALLS-RI (FIGURA 84) tendo sua massa molar ponderal média (M_w) estimada através da curva padrão de dextrana em $2,1 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$. O cromatograma detectado pelo índice de refração mostrou um pico de base alargada com 46,25 min de retenção.

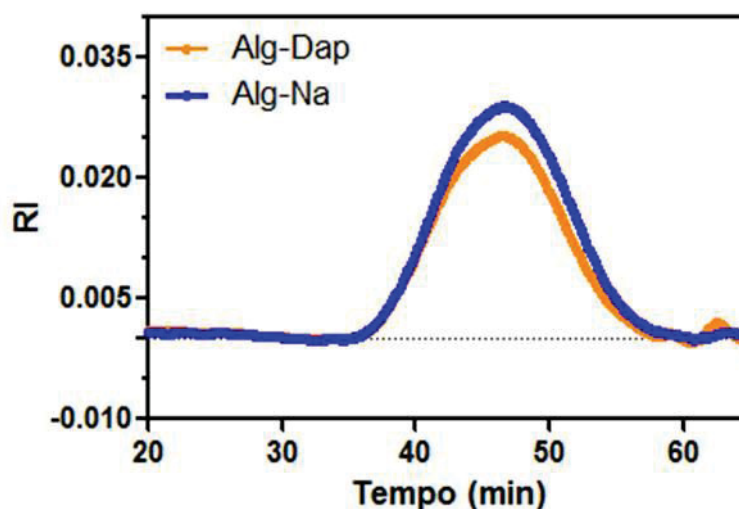
O perfil de eluição das frações: Alg-Na e Alg-Dap (FIGURA 85), apresenta similaridade quanto o tempo de retenção em 46,17 e 46,25 min, respectivamente. Adicionalmente, as massas ponderais estimadas médias (M_w) calculadas também são similares, indicando que mesmo com o incremento de massa (adição da DAP), não ocorre um aumento de massa significativo, devido provavelmente a processos de despolimerização que ocorreram durante a reação de amidação.

FIGURA 84 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO ALG-DAP



RI: *refractive index*; LS: *Laser-light scattering*. FONTE: O autor(2018).

FIGURA 85 – HPSEC DAS FRAÇÕES ALG E ALG-DAP

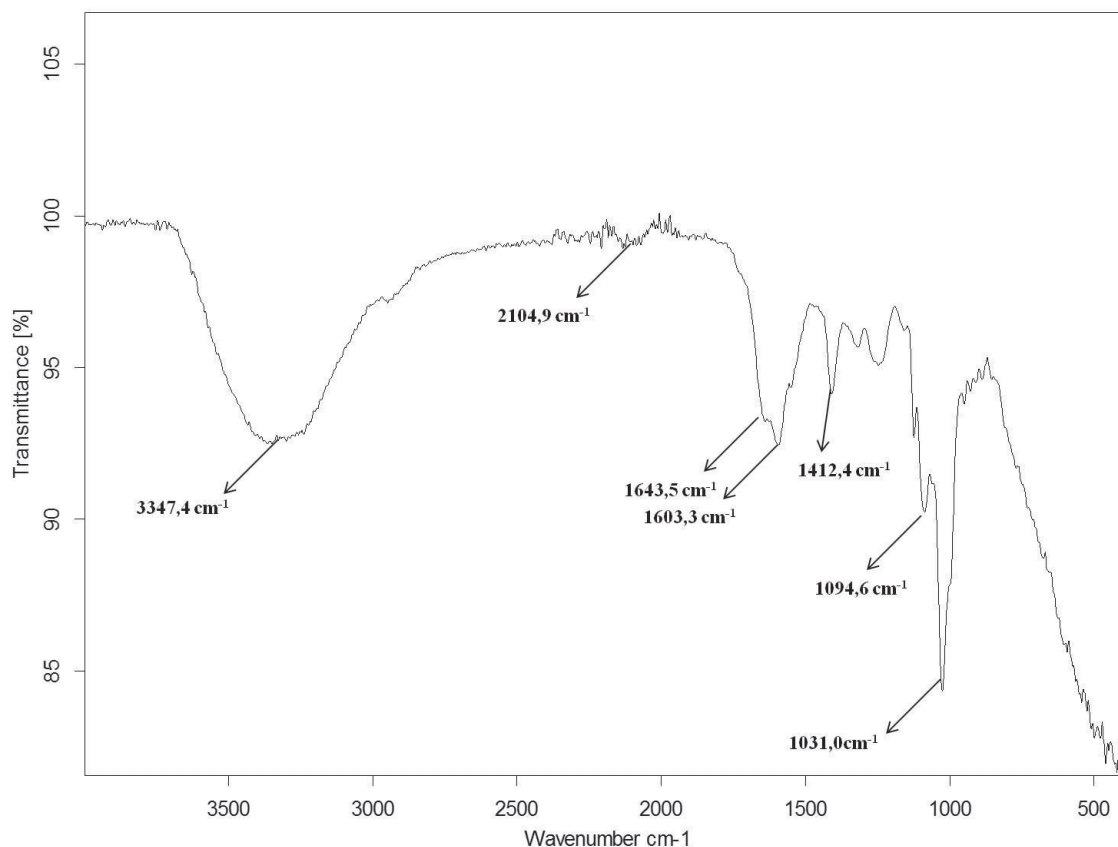


RI: *refractive index*. FONTE: O autor (2018).

Na FIGURA 86 está apresentando o espectro de infravermelho da fração Alg-Dap. Comparando o espectro desta fração amidada com sua fração de origem (Alg-Na), foi identificado o alargamento da banda em $1600,0\text{ cm}^{-1}$, presente no alginato de sódio, referente ao estiramento vibracional assimétrico do carboxilado O-C-O. Foram observadas duas bandas uma em $1643,5\text{ cm}^{-1}$ e $1603,3\text{ cm}^{-1}$, as quais são características da função amida (SILVERSTEIN, BASSLER E MORRILL, 1991). Estes assinalamentos estão de acordo com o reportado na literatura, onde CHHATBAR e colaboradores (2011), assinalaram as bandas

referente a função amida nos espectros de FT-IR do alginato amidado, com a hidrazina, 1,2-etilenodiamina, 1,6-hexanodiamina e trans-1,4-ciclohexanodiamina, em 1540 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} , 1596 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} respectivamente.

FIGURA 86 – ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DA FRAÇÃO ALG-DAP



Wavenumber: número de onda; *Transmittance*: transmitância. FONTE: O autor (2018).

4.2.5 Semissíntese de BM-Dap e BG-Dap

As reações de amidação dos blocos BM e BG foram realizadas utilizando as mesmas condições reacionais que a reação preparativa para produção do Alg-Dap.

Da mesma forma como a massa de 1 mol de alginato de sódio foi considerado na secção de otimização da reação, considerou-se 1 mol do bloco BM e do bloco BG o equivalente a: 216,0 g, massa esta equivalente a uma unidade monossacarídica.

Sendo assim, as duas reações de amidação dos blocos BM e BG foram realizadas utilizando as razões estequiométricas de 1 mol do bloco, em tampão MES ($0,2\text{ mol.L}^{-1}$), pH 6,5, com a relação de 2 mols de EDC:1 mol de NHS e 20 mols de 1,3-propanodiamina (DAP).

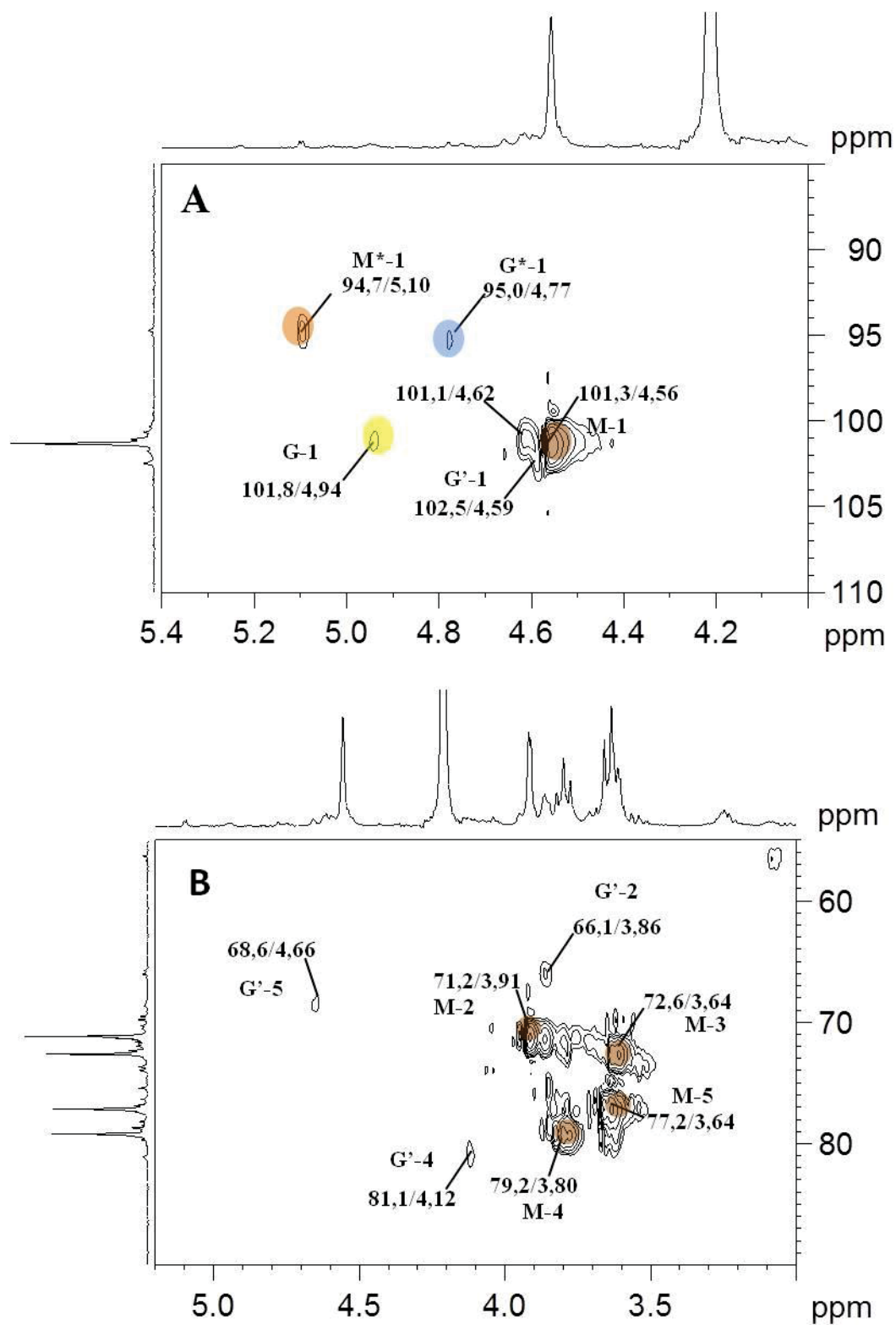
As amostras foram amidadas, dialisadas sequencialmente e exaustivamente contra água destilada, NaCl 1 mol L⁻¹, água destilada em membranas de MWCO 6-8 KDa, e liofilizada, resultando nos produtos amidados reduzidos BM-Dap e BG-Dap, com rendimentos de recuperação de 78,5 e 81,7%, respectivamente. Ressalta-se que a fração BG-DAP foi reduzida com borohidreto de sódio *overnight* e dialisada novamente contra água destilada e liofilizada antes da realização das análises químicas e espectroscópicas. Diferentemente, a fração BM-Dap foi analisada na sua forma redutora, sem realizar a redução com borohidreto de sódio.

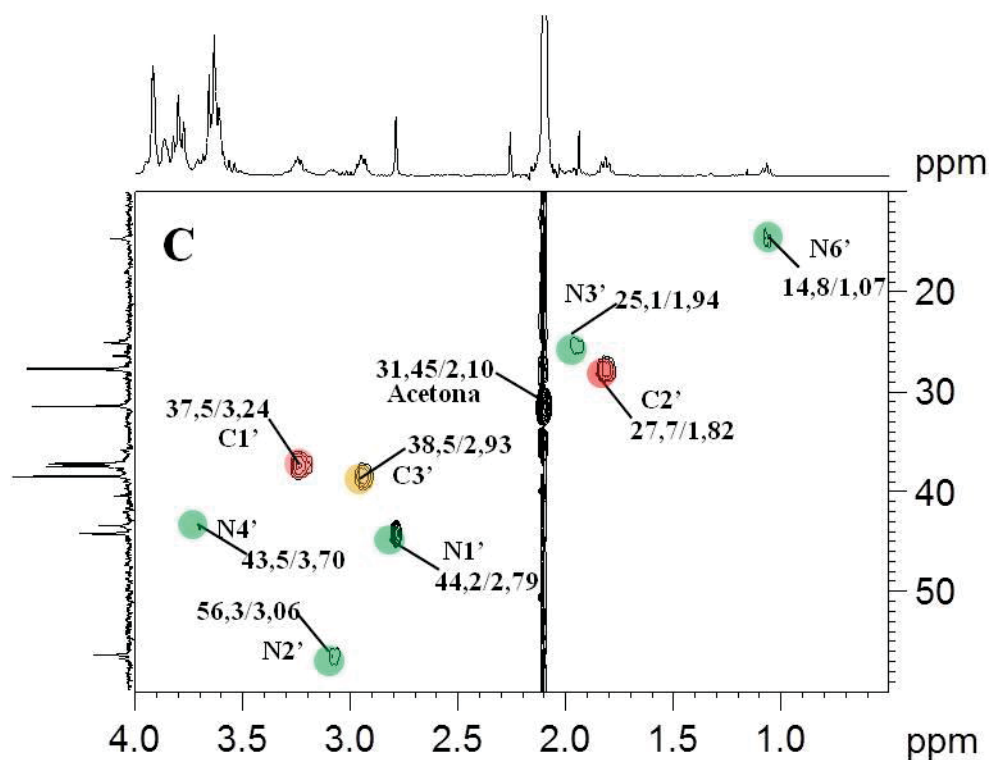
De acordo com a análise de RMN de HSQC da fração BM-Dap foi possível assinalar os C/H das unidades de ácido β -D-manurônico que constituem o bloco BM (C1/H1 – C5/H5 em 101,1/4,55, 71,2/3,91, 72,6/3,64, 79,2/3,80 e 77,2/3,64 ppm, respectivamente) (FIGURA 87 A e B). Na FIGURA 87 (C), foram assinaladas três novas correlações, em 37,5/3,24, 27,7/1,80 e 38,5/2,93 ppm, atribuídos a C1'/H1', C2'/H2' e C3'/H3', respectivamente, correspondentes ao *N*-(3-aminopropil)-amida, E da mesma forma como na fração Alg-Dap, o espectro de BM-Dap não apresentou deslocamentos químicos, causados pela nova ligação amida, nos C1-C5/H1-H5 das unidade amidadas.

Além das correlações referentes as unidades de β -D-ManAp e do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida, foram identificadas correlações referentes a *O*-acilisouréia e *N*-acilisouréia (FIGURA 87 C), da mesma forma como identificados e assinalados na reação de amidação do alginato de sódio (fração Alg-Dap).

Através do espectro de RMN de ¹³C da fração BM-Dap, foi possível identificar o sinal em 171,6 ppm referente a carbonila das unidades de β -D-ManAp amidadas com a DAP, além da presença da carboxila sem modificação nesta mesma unidade em 175,8 ppm. Adicionalmente os sinais em 176,6 e 172,3 ppm são referentes as carbonilas das unidades de α -L-GulAp antes e após amidação, respectivamente. Estes assinalamentos foram realizados com base na comparação dos espectros de RMN de ¹³C do bloco BM antes e após modificação (BM-Dap), como apresentado na FIGURA 88.

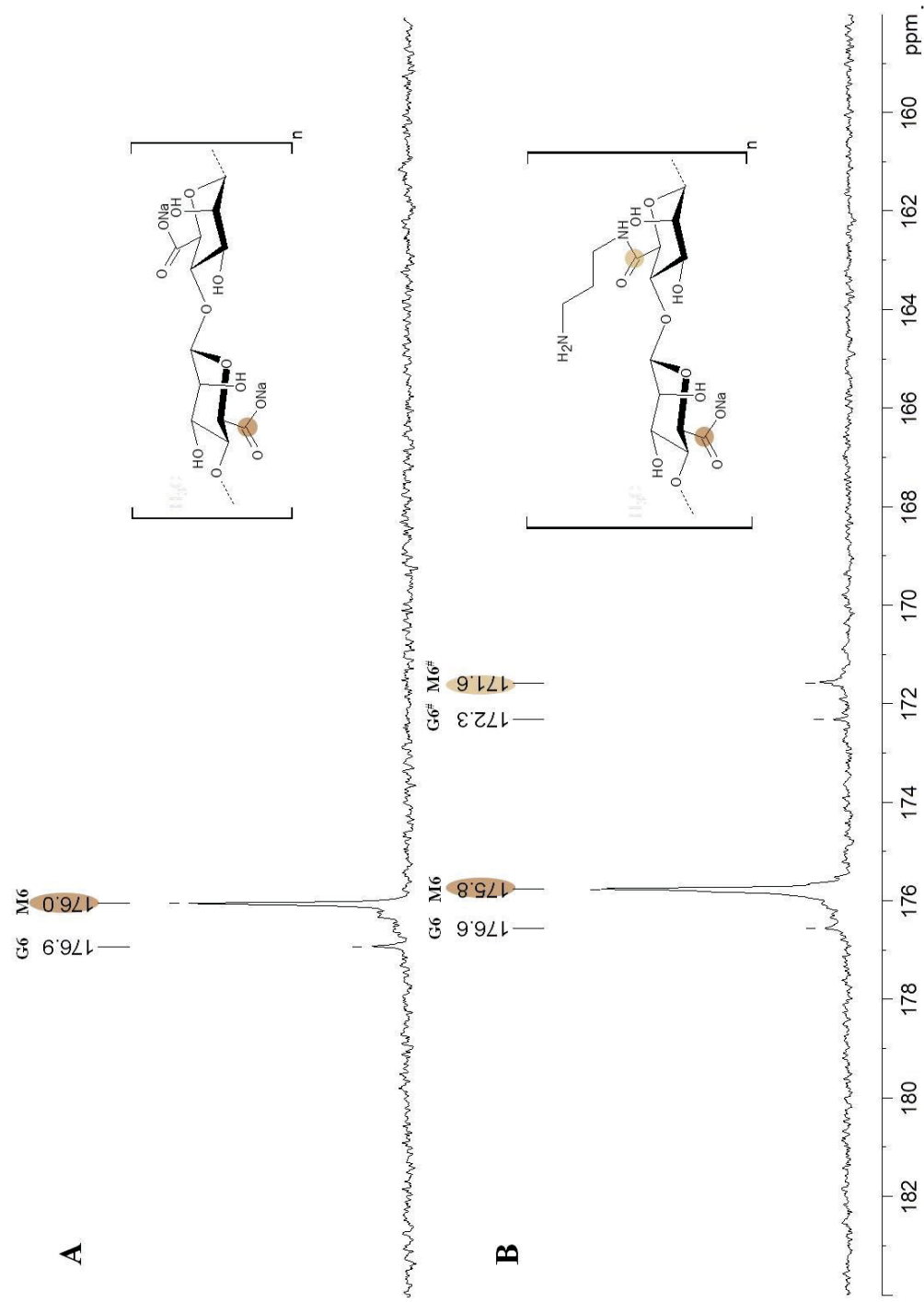
FIGURA 87 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO BM-DAP (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO *N*-(3-AMINOPROPIL)-AMIDA.





Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,10). M1-M5, M1*, G1, G'1 e G1* representam os carbonos das unidades de β -D-ManAp 4-ligada (BMM), D-ManAp terminal redutor, α -L-GulAp 4-ligada (BGG), α -L-GulAp 4-ligada (BGM) e L-GulAp terminal redutor, respectivamente. C1'-C3 são referentes aos C/H do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida, e N' representa os C/H dos subproduto *N*-acilisouréia. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 88 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO DAS CARBOXILAS DO BLOCO BM (A) E DA FRAÇÃO BM-DAP (B)



Solvente: D_2O , 70°C ; acetona como padrão interno (31,45). M6 e M6[#] representam os carbonos carbonílicos das unidades de β -D-ManAp sem modificações e β -D-ManAp amidada com a DAP, respectivamente, e G6 representa o carbono carbonílico da unidade de α -L-GulAp. FONTE: O autor (2018).

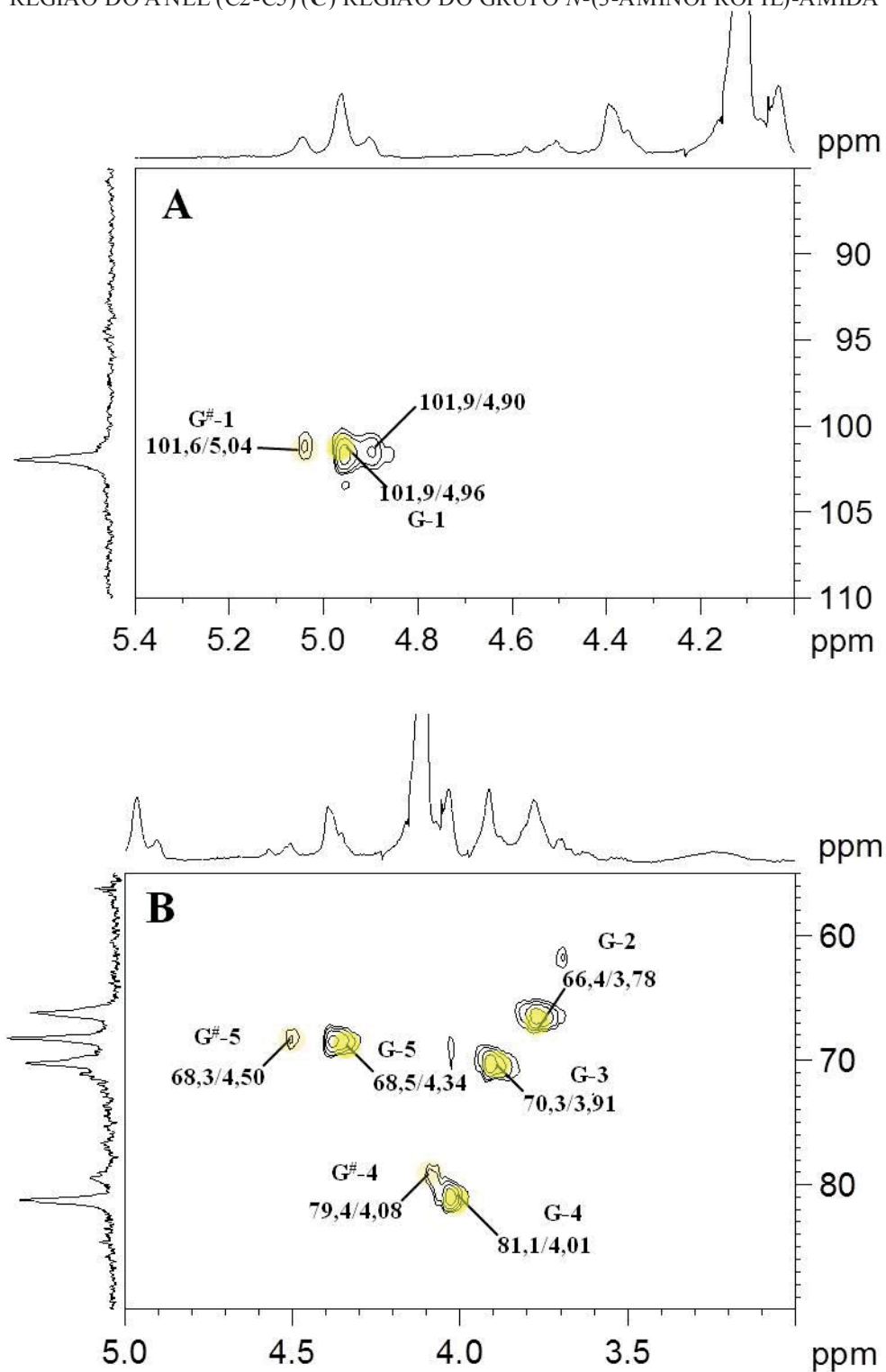
A análise de RMN de HSQC da fração BG-Dap (FIGURA 89 (A e B)) permitiu assinalar os C/H do bloco BG. O sinal em 101,9/4,96 ppm é referente ao C1/H1 do α -L-GulAp (1 \rightarrow 4), e os sinais em 66,4/3,78, 70,3/3,91, 81,1/4,01 e 68,5/4,34 ppm correspondem aos C2/H2, C3/H3, C4/H4 e C5/H5 da mesma unidade. Adicionalmente, as correlações em 37,3/3,24, 27,8/1,80 e 38,5/2,93 ppm foram atribuídas aos C1'/H1', C2'/H2' e C3'/H3', respectivamente do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida.

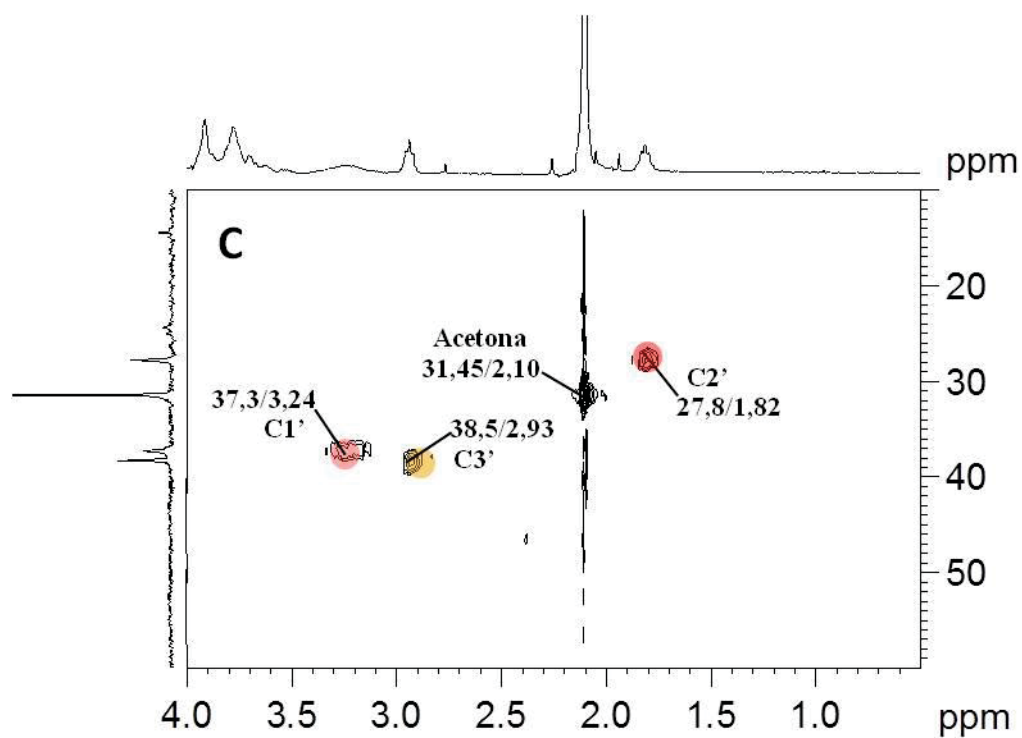
Diferente dos espectros de RMN das frações amidadas Alg-Dap e BM-Dap, o espectro de RMN da fração BG-Dap apresentou deslocamento químico em C4/H4 e C5/H5, quando o grupo carboxila do ácido gulurônico foi amidado. Através da análise do espectro de RMN de COSY ^1H - ^1H (ANEXO 5, pg. 329), a correlação em 101,6/5,04 ppm foi atribuída ao C1/H1 do α -L-GulAp amidado com a DAP. As correlações em 79,4/4,08 e 68,3/4,50 ppm correspondem aos C4/H4 e C5/H5 desta unidade amidada, as quais apresentaram um deslocamento químico de -1,7/+0,07 ppm e -0,02/+0,16 ppm, respectivamente, em comparação com seus correspondentes valores no bloco BG. Estes deslocamentos químicos observados nas posições C4 e C5, estão de acordo com o descrito na literatura. O efeito causado nestas duas posições nas unidades de α -L-GulAp, quando o alginato é amidado com uma diamina de 6 carbonos (1,6-hexadiamina - HDA) são de aproximadamente -1,45/+0,00 ppm e -1,19/+0,03 ppm, respectivamente (CHHATBAR et al., (2011)). O deslocamento em maior intensidade observado na fração BG-DAP, pode ser devido a influência do tamanho da cadeia alifática da diamina. A DAP tem apenas três carbonos, tendo um efeito mais pronunciado sobre o anel piranosídico, desta forma sua densidade eletrônica promove um maior efeito nas unidades 4 e 5 da α -L-GulAp, enquanto que a HDA por apresentar o dobro de carbonos, influenciando menos o anel piranosídico.

Outra diferença observada na fração BG-Dap, quando comparada com as frações Alg-Dap e BM-Dap, está no espectro de RMN de HSQC (FIGURA 89 C). Não foram observadas correlações atribuídas aos subprodutos da reação (*O*-acilisouréia e *N*-aciluréia). De modo diferente, no espectro de RMN de ^1H foram observados alguns sinais em baixa intensidade referente aos subprodutos, os quais foram quantificados como descrito a seguir.

A comparação dos espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 90) da fração BG-Dap e do bloco BG, permitiu identificar o deslocamento químico do carbono carbonílico sem modificação (176,3 ppm) e da carbonila amidada com a DAP (172,1 ppm). Após a amidação, C6 das unidades de ácido α -L-GulAp apresentou um efeito alfa de -4,2 ppm.

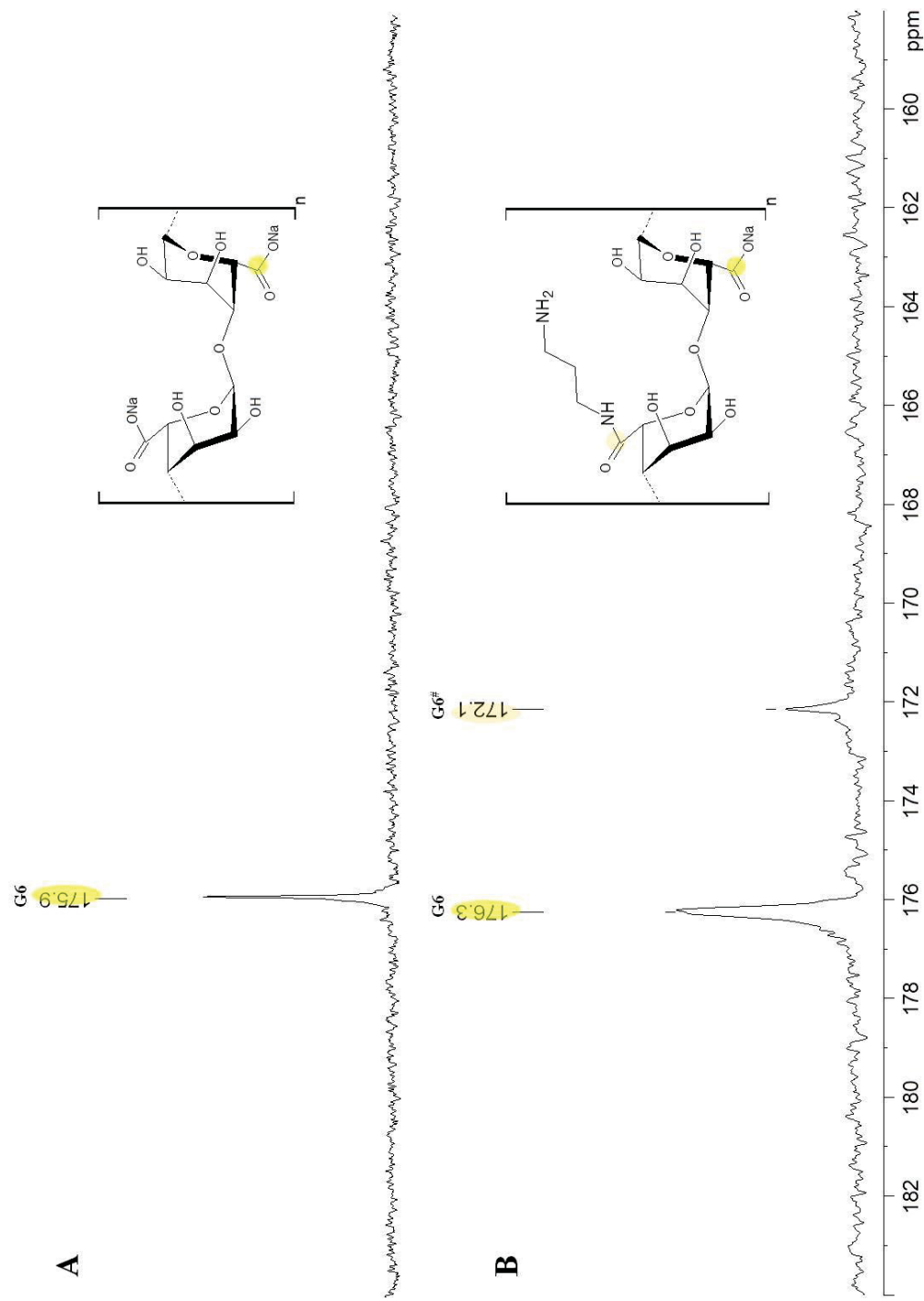
FIGURA 89 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO BG-DAP (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO *N*-(3-AMINOPROPIL)-AMIDA





Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,10). G-1 – G-5, e G[#]-1 – G[#]-5, representam os C/H das unidades de α -L-GulAp e α -L-GulAp amidados, respectivamente, constituindo o bloco BM. Enquanto C1' - C3' são referentes aos C/H do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 90 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO DAS CARBOXILAS DO BLOCO BG (A) E DA FRAÇÃO BG-DAP (B)



Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (31,45). G6 e G6[#] representam os carbonos carbonílicos das unidades de $\alpha\text{-L-GulAp}$ sem modificações e de $\alpha\text{-L-GulAp}$ amidada com a DAP, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

Os assinalamentos de ^1H e ^{13}C das unidades constituintes das frações polissacarídicas amidadas: BM-Dap e BG-Dap estão apresentados na TABELA 23.

TABELA 23 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES BM-DAP E BG-DAP

Unidades	Blocos		BM-Dap	BG-Dap
[\rightarrow 4)- β -D-ManAp-(1 \rightarrow]	BM	1	101,3/4,55	-
		2	71,3/3,91	-
		3	72,6/3,64	-
		4	79,2/3,80	-
		5	77,2/3,64	-
		6	175,8	-
		6 [#]	171,6	-
[\rightarrow 4)- α -L-GulAp-(1 \rightarrow]	BG	1	-	101,9/4,96
		1 [#]	-	101,6/5,04
		2	-	66,4/3,78
		3	-	70,3/3,91
		4	-	81,1/4,01
		4 [#]	-	79,4/4,08
		5	-	68,5/4,34
		5 [#]	-	68,3/4,50
		6	-	176,3
		6 [#]	-	172,1
1,3-propanodiamina	DAP	C1'	37,5/3,24	37,3/3,24
		C2'	27,7/1,80	27,8/1,80
		C3'	38,5/2,93	38,5/2,93

n.d.= Não determinado. # são referentes as posições das unidades com as carbonilas C6 amidadas e DAP corresponde a 1,3-propanodiamina acoplada a carbonila dos ácidos urônicos. FONTE: O Autor (2018).

O mesmo cálculo utilizado na quantificação do grau de substituição nas reações de otimização e da fração Alg-Dap, foi realizado para as frações BM-Dap e BG-Dap através dos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 91 e 92) para se calcular através de integração a porcentagem de produto formado (amidação), e de subproduto e/ou produto secundário (*N*-aciluréia ou *O*-acilisouréia). O sinal em 1,81 ppm é referente ao C2' da 1,3-propanodiamina no produto da reação ($\text{R-CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$). Já o sinal em 2,79 ppm, é atribuído aos 2 grupos metílicos da *N*-aciluréia e *O*-acilisouréia ($\text{R-NH}^+(\text{CH}_3)_2$). Além disto, o somatório dos principais sinais anoméricos nas frações BM-Dap e BG-Dap também foram utilizados. Desta forma, a fim de se determinar a relação de produto (P):subproduto (SP) formado nas reações, foi realizada uma relação entre a área de integração do sinal 1,81 e 2,79 ppm, divididas pelo número de hidrogênios respectivo de cada sinal. Além disto, foi considerado para o cálculo

que a área referente a DAP consiste em 1 unidade amidada, e que o somatório das áreas dos H anoméricos correspondem a 100% do polissacarídeo.

Através da integração dos sinais do espectro de RMN, 11,0% da fração BM-Dap está amidada, e 3,4% como subproduto. Desta forma 76,4% do total de carboxilas modificadas, referem-se ao grupo N-(3-aminopropil)-amida. Já para a fração BG-Dap 20,8% da fração está amidada, e apenas 0,5% como subproduto, ou seja 97,6% do total de carboxilas modificadas referem-se ao grupo N-(3-aminopropil)-amida.

É possível fazer uma relação de moléculas amidadas e das não modificadas, onde a cada 10 moléculas de ácido β -D-manurônico na fração BM-Dap, uma está amidadas com a DAP, enquanto que na fração BG-Dap a cada 10 moléculas de ácido α -L-gulurônico, duas unidade estão amidadas com a DAP.

Adicionalmente, o grau de substituição foi determinado como descrito por TAUBNER; MAROUNEK; SYNYTSYA (2017) através da análise elementar de N e C. A TABELA 24 apresenta os resultados das análises elementares de nitrogênio e carbono dos blocos BM e BG e de seus respectivos produtos modificados.

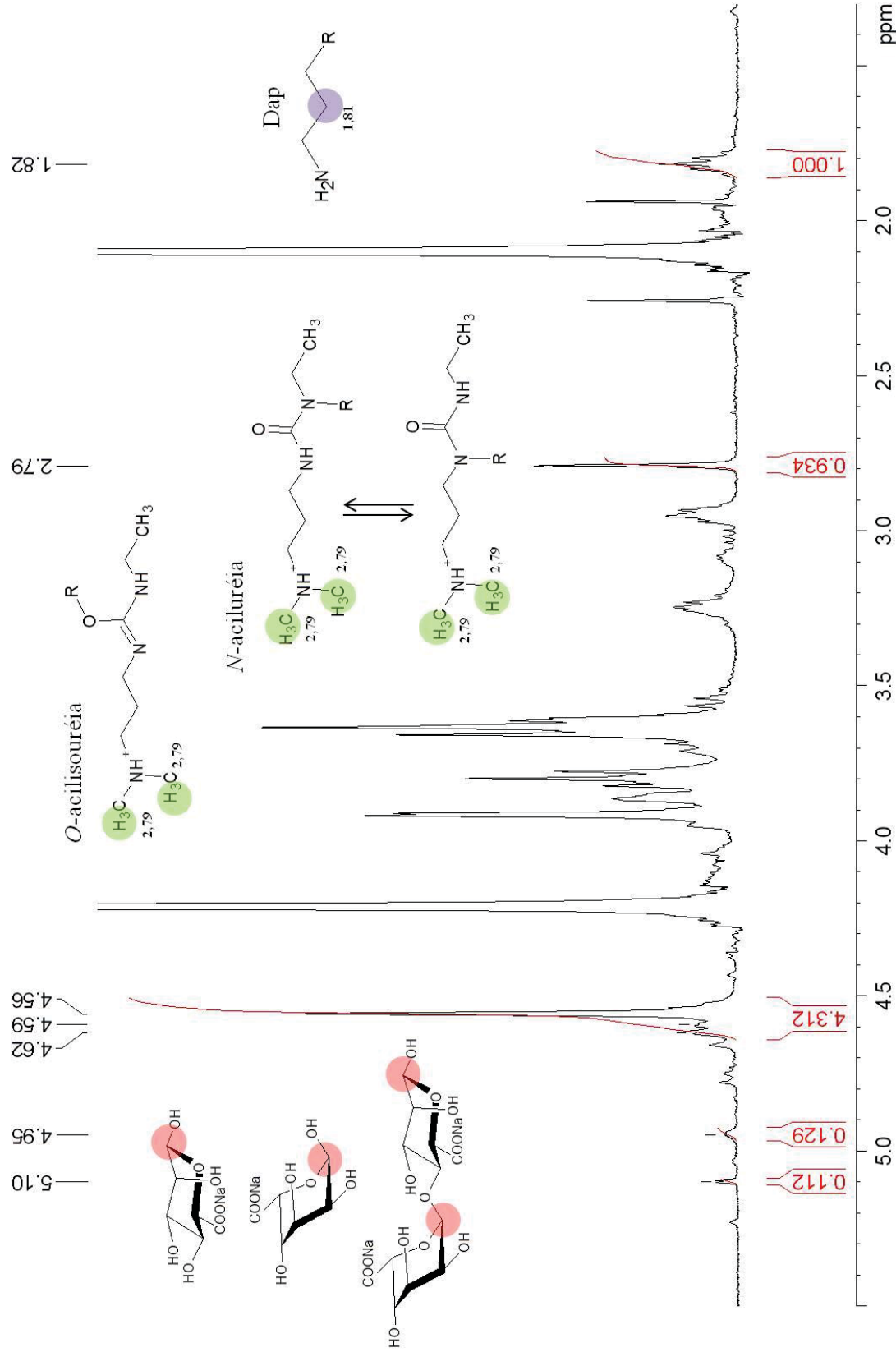
TABELA 24 ANÁLISE ELEMENTAR DAS FRAÇÕES NATIVAS E MODIFICADAS VIA AMIDAÇÃO DOS BLOCOS BM E BG

Fração	N (%)	C (%)	DA (mol %)
Bloco BM	0,07	36,19	-
BM-Dap	1,91	32,93	16,1
Bloco BG	0,06	30,66	-
BG-Dap	2,66	34,88	21,8

N% e C % corresponde aos percentuais de nitrogênio e carbono. DA grau de substituição de amino a cada 1 mol. FONTE: O autor (2018).

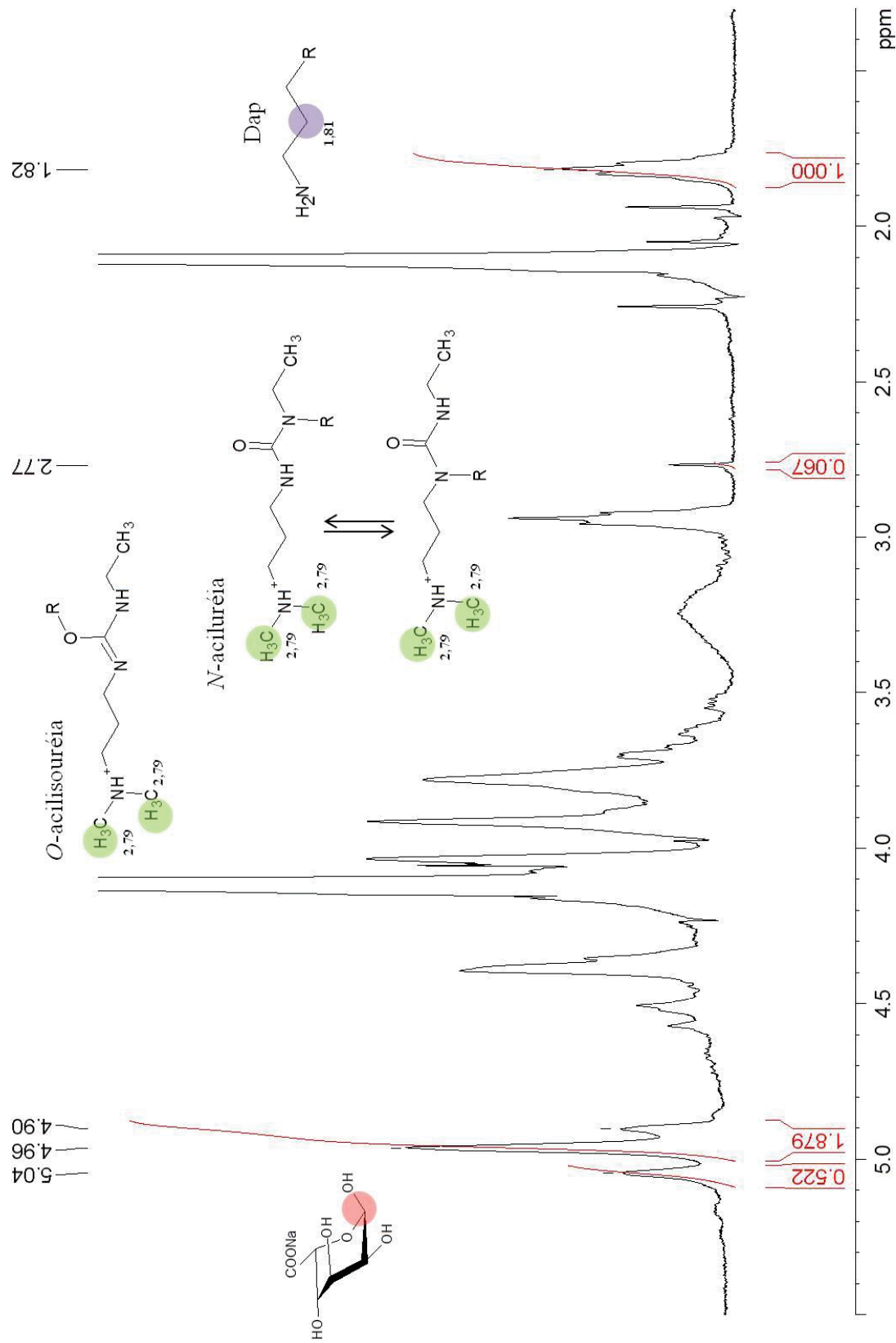
Comparando os resultados da determinação do grau de substituição através das análises de RMN de ^1H com os resultados a partir das análises elementares de N e C conclui-se que estão relativamente próximos os valores, pois foram obtidos os percentuais de 14,4% e 16,1% de modificação para a fração BM-Dap, através das técnicas de RMN e análise elementar, respectivamente. Do mesmo modo para a fração BG-Dap, foram obtidos 21,3% e 21,8% de modificação, pelas análises de RMN e elementar, respectivamente.

FIGURA 91 – INTEGRAÇÃO DOS SINAIS NO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO BM-DAP



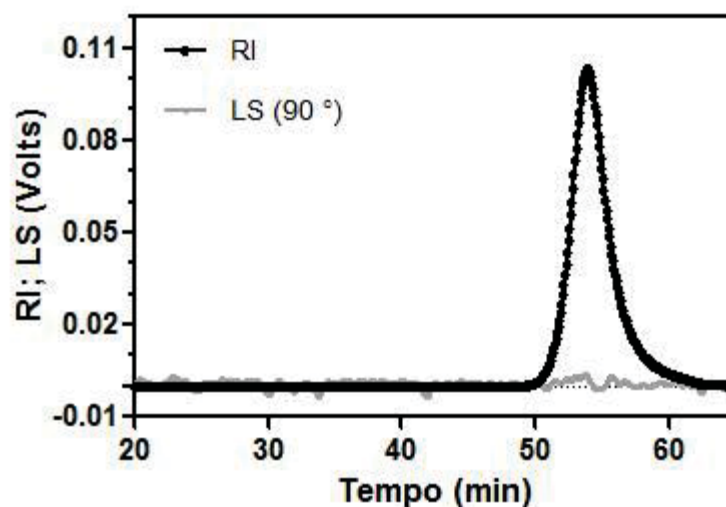
Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (2,10 ppm). R: unidades de α -L-GulAp ou β -D-ManA e DAP: 1,3-propanodiamina. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 92 – INTEGRAÇÃO DOS SINAIS NO ESPECTRO DE RMN DE ¹H DA FRAÇÃO BG-DAP



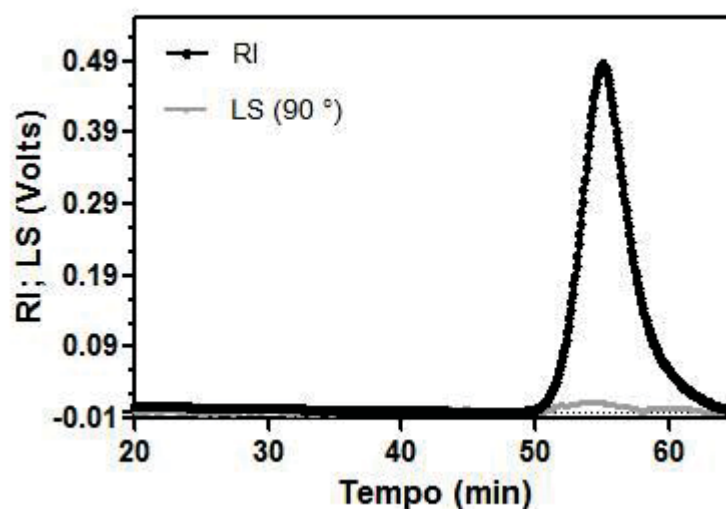
Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (2, 10 ppm). R: unidades de α-L-GulAp ou β-D-ManAp e DAP: 1,3-propanodiamina. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 94 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO BM-DAP



RI: *refractive index*; LS: *Laser-light scattering*. FONTE: O autor (2018).

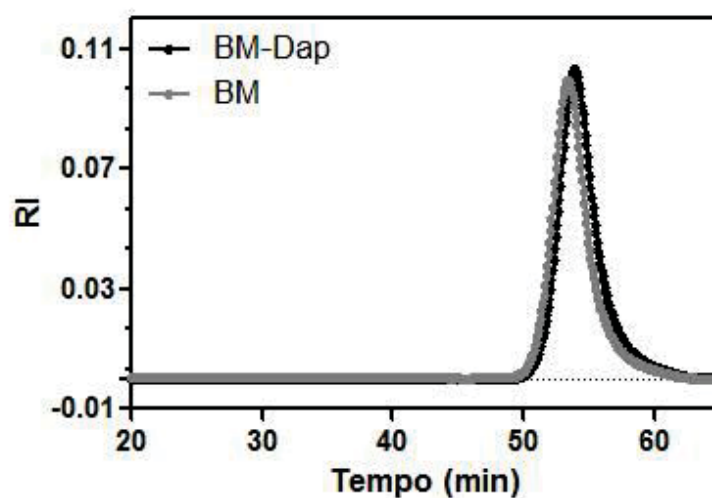
FIGURA 95 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO BG-DAP



RI: *refractive index*; LS: *Laser-light scattering*. FONTE: O autor(2018).

Comparando os perfis de eluição do bloco BM e da fração BM-Dap (FIGURA 96), foi observado um tempo de retenção menor para o bloco BM (53,25 min) em relação ao seu produto amidado (53,83 min), o que condiz com o cálculo da massa molar ponderal média estimada da fração amidada ser menor que sua precursora.

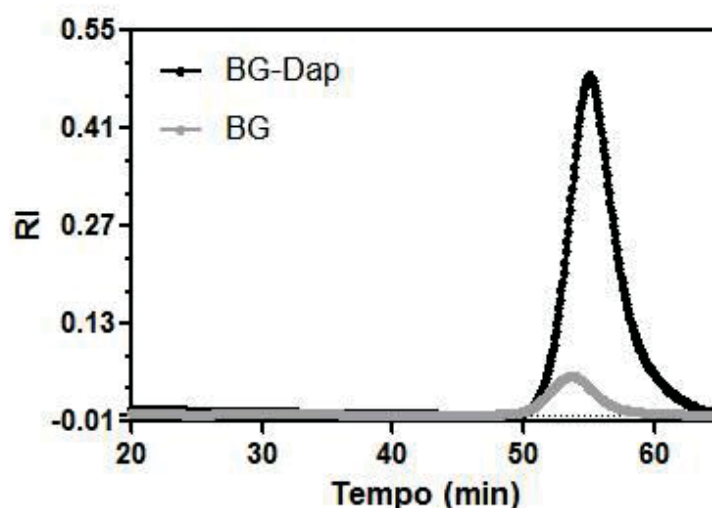
FIGURA 96 – HPSEC DO BLOCO BM E DA FRAÇÃO BM-DAP



RI: *refractive index*. FONTE: O autor (2018).

De modo similar, o perfil de eluição da fração BG-Dap também foi comparado ao bloco BG (FIGURA 97), sendo possível observar um tempo de retenção menor para o bloco BG (53,5 min) do que para seu correspondente produto amidado BG-Dap (54,8 min), o que condiz com o cálculo da massa molar ponderal média estimada da fração amidada também ser menor que o da sua fração de origem.

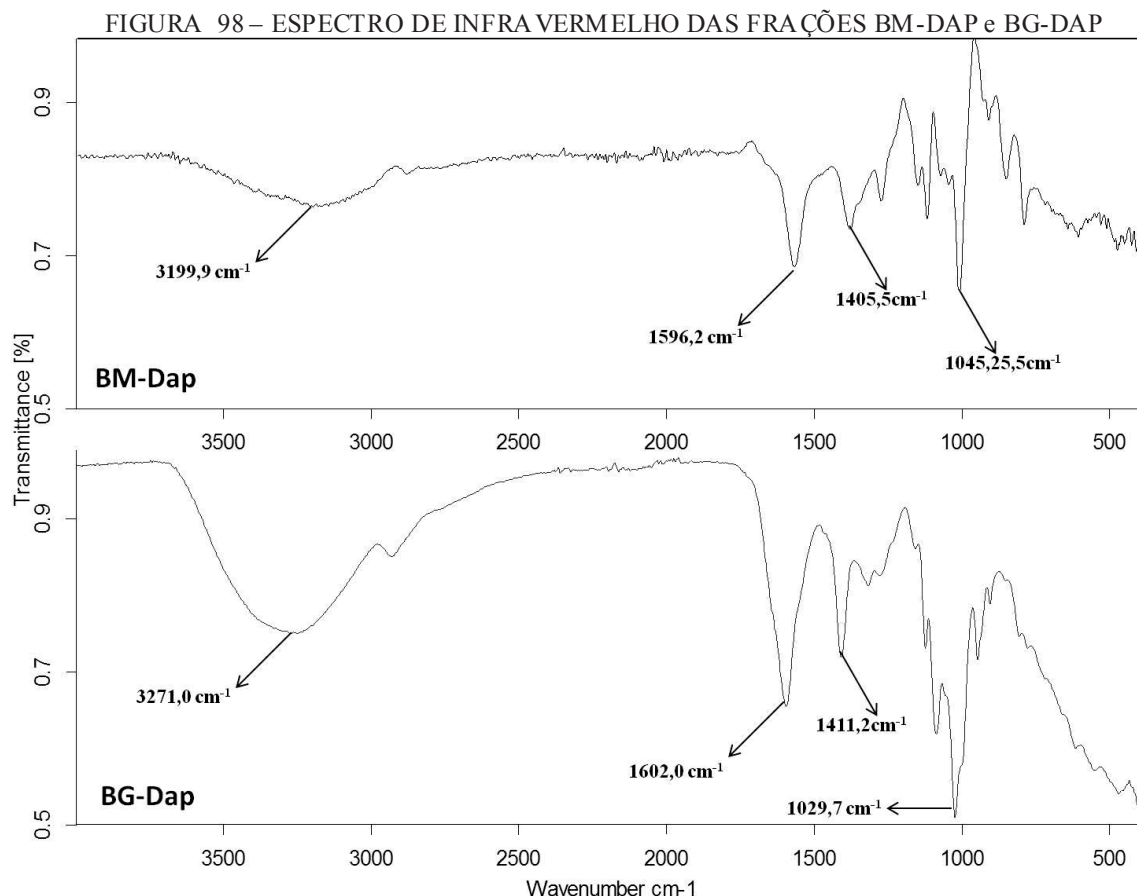
FIGURA 97 – HPSEC DO BLOCO BG E DA FRAÇÃO BG-DAP



RI: *refractive index*. FONTE: O autor (2018).

Os espectros de infravermelho das frações BM-Dap e BG-Dap representadas na FIGURA 98, não apresentaram grande variação com relação a seus respectivos espectros

nativos. Exceto pelo alargamento da banda em $1602,0 - 1596,2 \text{ cm}^{-1}$ indicando uma modificação no estiramento vibracional da carbonila, sugerindo a presença da função amina (SILVERSTEIN, BASSLER E MORRILL, 1991).



Wavenumber: número de onda; Transmittance: transmitância. FONTE: O autor (2018).

Em resumo no presente trabalho foi possível produzir e caracterizar os polissacarídeos amidados com a 1,3-propanodiamina (Alg-Dap, BM-Dap, e BG-Dap), com graus de amidação que variaram entre 14,4 – 21,8 mol%. Estes materiais podem ser utilizados para produção de polissacarídeos híbridos inéditos através reações de aminação redutiva com os dissacarídeos de carrabiose 4²-sulfato produzidos anteriormente.

4.2.6 Semissínte de de polissacarídeos híbridos carboxilados e sulfatados via aminação redutiva dos derivados do alginato

As próximas etapas para produção dos polissacarídeos híbridos serão realizadas a partir dos polissacarídeos amidados (frações Alg-Dap, BM-Dap e BG-Dap), via aminações redutivas com *k*-carrabiose, oligossacarídeo sulfatado obtido a partir de *kappa*-carragenana.

A carrabiose 4²-sulfato apresenta em sua extremidade o grupo aldeído, e as frações modificadas (Alg-Dap, BM-Dap e BG-Dap), possuem amina primária livre, oriunda do grupo *N*-(3-aminopropil)-amido, sendo capaz de realizar o ataque nucleofílico à carbonila da *k*-carrabiose, produzindo o íon imínio, que em seguida será reduzido pelo agente redutor.

Para que não houvesse competição entre as extremidades redutoras dos blocos BM e BG com as da *k*-carrabiose, foi necessário realizar redução das pontas aldeídicas dos blocos BM e BG antes de realizar a reação de aminação redutiva. Entretanto a fração BG-Dap foi reduzida com borohidreto de sódio *overnight*, logo após a reação de amidação, sendo necessário a redução apenas do bloco BM-Dap nesta etapa. Desta forma a fração BM-Dap foi reduzida com borohidreto de sódio *overnight* e dialisada contra água destilada (membrana de WMC0 6-8 kDa) e liofilizada.

Foram considerados para os cálculos estequiométricos das reações que 1 mol da fração Alg-Dap, BM-Dap, BG-Dap e KD correspondem a 482,2 g.mol⁻¹, 250,1 g.mol⁻¹, 250,1 g.mol⁻¹ e 426,0 g.mol⁻¹, respectivamente.

4.2.6.1 Semissíntese de Alg-KD

A fração Alg-Kd foi obtida a partir da reação de aminação redutiva utilizando a fração Alg-Dap com a fração KD. Foram utilizados para cada 1 mol da fração amidada, 10 mols de dissacarídeos redutores, proporcionando um excesso de unidades aldeídicas passíveis do ataque nucleofílico da amina primária presente na fração Alg-Dap. Este excesso de aldeído foi utilizado a fim de deslocar o equilíbrio da reação para formação iminas.

O rendimento de recuperação do produto (Alg-KD) foi de 167,5% e como a massa recuperada foi maior que a massa inicial, é possível sugerir que moléculas presentes na fração KD foram ligadas covalentemente a fração Alg-Dap. Destaca-se que os oligossacarídeos presentes na fração KD são moléculas pequenas e após a diálise elas seriam eliminadas pelos poros da membrana de diálise, permanecendo retido somente moléculas que apresentem uma massa molecular maior que MWCO 6-8 KDa.

Através da análise de RMN de HSQC-editado foi possível assinalar e identificar novas correlações, além das já apresentadas para a fração Alg-Dap. No espectro de RMN de HSQC-editado da região anomérica (FIGURA 99 A) uma nova correlação em 104,2/4,42 ppm foi atribuída ao C1/H1 das unidades β -D-Galp 4-sulfato, da *k*-carrabiose. Adicionalmente as correlações em 101,9/4,94 e 101,3/4,56 ppm correspondem as unidades de α -L-GulAp e β -D-ManAp, respectivamente.

Foram observadas (FIGURA 99 B), três correlações em fase negativa, referente a grupo $-\text{CH}_2-$. Estas correlações foram assinaladas como sendo os C6/H6 das unidades constituintes da carrabiose 4²-sulfato, em 62,2/3,70 e 74,4/3,91/3,77 ppm, atribuídas ao C6 das unidades de β -D-Galp 4-sulfato e 3,6-anidro-D-galactose, respectivamente. As correlações em 72,2/3,45, 72,7/3,66, 77,7/4,56 e 75,8/3,74 ppm foram atribuídas aos C2/H2, C3/H3, C4/H4 e C5/H5 das unidades de β -D-Galp 4-sulfato, respectivamente. Após a ligação do dissacarídeo, os deslocamentos químicos de C1-C6/H1-H6 da unidade de galactose 4-sulfato não apresentaram grandes diferenças em seus deslocamentos químicos quando comparados ao dissacarídeo na forma redutora (KD livre). Já os C2-C5/H2-H5 das unidades de 3,6-anidro-D-galactose, antes da ligação com a amina, apresentavam valores de 74,4/3,55, 83,7/3,96, 88,1/4,17, e 76,6/4,37 ppm, que após a ligação com o grupo amino exibiram novos deslocamentos em 67,4/4,07, 85,2/3,81, 87,8/4,08 e 76,6/4,40 ppm, respectivamente. Além disto, foi identificado uma nova correlação (FIGURA 99 C), em 51,1/3,15 ppm, atribuída ao C1/H1 aminado das unidades de 3,6-anidro-D-galactose. Através das análises dos espectros de RMN homonucleares COSY e TOCSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ (ANEXO 8 e 9, pg. 332 e 333) foi possível confirmar os assinalamentos dos prótons H1, H2 e H3 das unidades de 3,6-anidro-D-galactose, onde o sinal em 3,15 ppm correlaciona-se com 4,07 ppm, e este com o sinal em 3,81 ppm (C1/H1 C2/H2 e C3/H3, respectivamente).

Esta variação dos deslocamentos químicos das unidades da carrabiose 4²-sulfato em ambientes químicos diferenciados (amino e aldeídico), está de acordo com relatos da literatura. Tanto ORSATO (2007), como DUCATTI (2009), sintetizaram e caracterizaram derivados da carrabiose 4²-sulfato inserindo grupos amino, produziram o aminocarrabitol e a 4-*O*-sulfonato- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-1-pentilamino-3,6-anidro-D-galactitol. Os assinalamentos realizados pelos autores para carbono-1 das unidades de 3,6-anidro-D-Galp foram 42,0 e 49,6 ppm, respectivamente. Além destes assinalamentos, COLODI (2017) também aminou redutivamente este dissacarídeo, apresentando o C1 em 51,1 ppm, com a mesma amina utilizada no presente trabalho. Desta forma os assinalamentos aqui realizados estão coerentes com os determinados por COLODI (2017).

Na FIGURA 99 (C) foram observadas outras correlações em fase negativa (CH_2) além do sinal em 51,1/3,15 ppm. Três das correlações apresentadas já foram assinaladas anteriormente na fração Alg-Dap, 37,5/3,24, 26,7/1,81 e 38,4/2,93 ppm, referentes a C1', C2' e C3' do grupo N-(3-aminopropil)-amida, respectivamente, entretanto a correlação em 38,4/2,93 apresentou uma menor intensidade que as outras duas correlações (37,3/3,24, 26,7/1,81). Além disto, foram observadas outras duas novas correlações 46,8/3,03 ppm e

26,4/1,86 ppm. Através do espectro de RMN de COSY ^1H - ^1H (ANEXO 8, pg. 332) foi possível determinar que o próton em 3,03 ppm correlaciona-se com 1,86 ppm. Desta forma, é possível afirmar que após a ligação da fração KD na extremidade (C3') da DAP, tanto o C3' como o C2' sofrem deslocamento químico. O sinal de C3' em 38,4/2,93 ppm, desloca-se para 46,8/3,03 ppm após a reação de aminação redutiva, enquanto C2' vai de 26,7/1,81 ppm para 26,4/1,86 ppm.

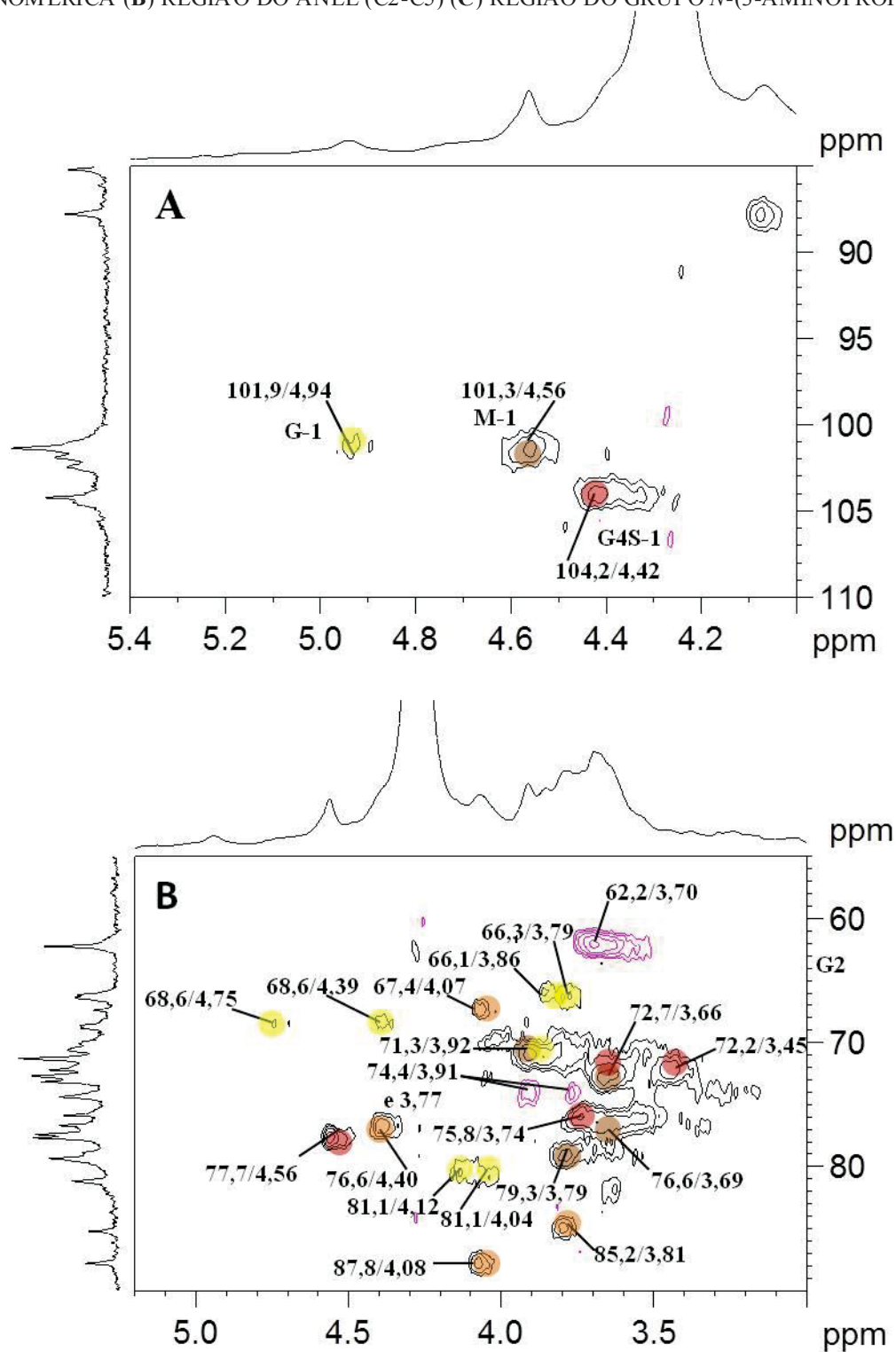
Além destas correlações identificadas em fase negativa (CH_2) (FIGURA 99 C), uma outra correlação anteriormente já observada em 44,2/2,78 ppm foi atribuída como sendo os dois grupos metílicos ($-\text{CH}_3$) dos subprodutos formados (*N*-aciluréia e *O*-acilisouréia).

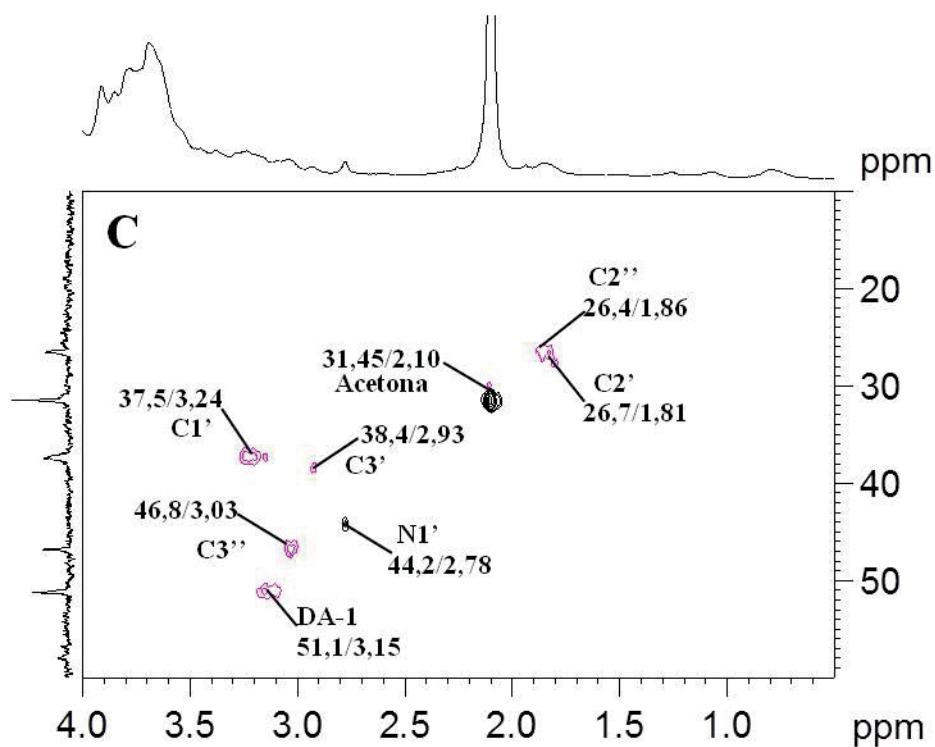
Além disso, é possível estimar através da integração das correlações referentes a C3' e C3'' no espectro de HSQC-editado (não demonstrado) que estão presentes para cada unidade C3', 3 unidades de C3''. Desta forma é possível afirmar que 75% das unidades de alginato amidadas com a 1,3-propanodiamina estão ligadas com a carrabiose 4²-sulfato, ou ainda que 75% do polissacarídeo amidado, está na forma o híbrido Alg-KD.

Adicionalmente, foram identificadas e assinaladas as correlações C1/H1 – C5/H5 das unidades α -L-GulAp e β -D-ManAp. Destaca-se que não foi possível assinalar os sinais referentes as carbonilas dos ácidos urônicos. Na TABELA 26, estão apresentados os assinalamentos de C/H das principais unidades constituintes do híbrido Alg-KD, entre eles as unidades de ácido α -L-gulurônico, ácido β -D-manurônico, β -D-galactopiranosose 4-sulfato, 3,6-anidrogactose, além da Dap.

A estrutura hipotética do polissacarídeo híbrido Alg-KD está representado na FIGURA 100, por uma cadeia principal constituída de unidades β -D-ManAp e α -L-GulAp, com enxertos da 1,3-propanodiamina, com uma das extremidades amidadas nas carbonilas do polissacarídeo da cadeia principal, podendo ainda ter a sua outra extremidade substituída ou não por unidades de carrabiose 4²-sulfato.

FIGURA 99 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO N-(3-AMINOPROPIL)





Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,10). (●), M (●) e GS4 (●) e DA (●) representam os C/H das unidades de α -L-GulAp, β -D-ManAp, β -D-Galp 4-sulfato e 3,6-anidro-D-Gal, respectivamente. Enquanto que C1'-C3' e C2''-C3'' são referentes aos C/H do grupo *N*-(3-aminopropil), e N1' referente ao produto secundário de amidação *N*-aciluréia e *O*-acilisouréia. FONTE: O autor (2018).

TABELA 25 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DO POLISSACÁRIDEO HÍBRIDO ALG-KD

Unidade	Sigla	^{13}C	^1H
[\rightarrow 4)- α -L-GulAp-(1 \rightarrow]	BG	1	101,9
		2	66,3
		3	71,3
		4	81,1
		5	68,6
		6	n.d.
[\rightarrow 4)- β -D-ManAp-(1 \rightarrow]	BM	1	101,3
		2	71,3
		3	72,7
		4	79,3
		5	76,6
		6	n.d.
[\rightarrow 4)- α -L-GulAp-(1 \rightarrow \rightarrow 4)- β -D-ManAp-(1 \rightarrow]	BGM	1'	n.d.
		2'	66,1
		3'	n.d.
		4'	81,1
		5'	68,6
		6'	n.d.
[β -D-Galp 4-sulfato-(1 \rightarrow]	G4S	1	104,2
		2	72,2
		3	72,7
		4	77,7
		5	75,8
		6	62,2
[\rightarrow 4)1-desoxi-3,6-anidro-D-galactose	DA	1	51,1
		2	67,4
		3	85,2
		4	87,9
		5	76,6
		6	74,4
N'N'-propil	DAP	C1'	37,5
		C2'	26,7
		C2''	26,4
		C3'	38,4
		C3''	46,8

n.d.=não determinado. BG, BM e BGM correspondem aos blocos homopoliméricos e heteropolimérico respectivamente. G4S, DA e DAP correspondem a unidades de β -D-galactopiranosse 4-sulfato, 3,6-anidro-D-galactose e 1,3-propanodiamina, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

Foram realizadas determinações de N e C total por análise elementar, tanto na fração Alg-KD, como nas suas precursoras (Alg-Na, Alg-Dap, Kappa e KD) (TABELA 27).

Quando houve a inserção do dissacarídeo KD ao Alg-Dap, os valores de N total apresentaram uma diminuição significativa, indo de 2,22% para 1,90%, enquanto que o C total aumentou de 33,5% para 35,2%. Esta diminuição de N é devido à massa do dissacarídeo adicionada ao polímero, uma vez que este polissacarídeo não apresenta em sua constituição nitrogênio na sua forma nativa, sem modificações. Desta forma, ao aumentar a massa do polissacarídeo, mantendo o mesmo teor de nitrogênio o percentual tende a diminuir, como pode ser observado na TABELA 10. A mesma analogia pode ser feita para os percentuais de C. Quando aumentar a massa do polissacarídeo devido a adição do KD, aumentou-se os teores de carbono, aumentando assim o percentual de C na Fração Alg-KD.

Além disto não foi possível realizar a determinação dos teores de enxofre (S) e sulfato de sódio nos polissacarídeos de alginato, devido a presença de interferentes no método. As determinações de sulfato são realizadas através do método descrito por DODGSON (1961), utilizando meio ácido tanto no processo de hidrólise (HCl), como na formação do composto insolúvel de sulfato de bário (TCA). Desta forma, este meio ácido transforma o alginato em ácido algínico, causando a precipitação do polissacarídeo, interferindo nas leituras, pois este método de dosagem de enxofre é turbidimétrico.

TABELA 26 – DOSAGEM DE CARBONO E NITROGÊNIO NO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD E SEUS PRECURSORES

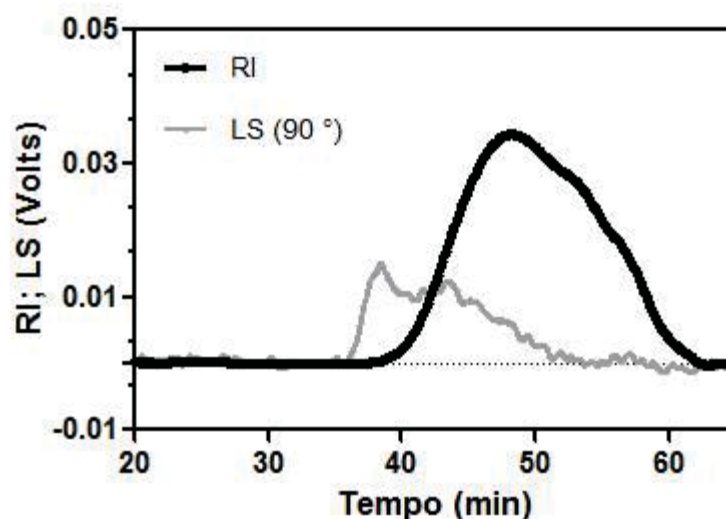
Fração	N (%)	C (%)	DA (mol %)
Alg-Na	0,17	30,50	-
Alg-Dap	2,22	33,55	18,61
K	0,35	24,76	-
KD	-	-	-
Alg-KD	1,90	35,18	-

N% e C % correspondem respectivamente aos percentuais de nitrogênio e carbono. DA é o grau de substituição de amino a cada 1 mol. FONTE: O autor (2018).

A fração Alg-KD foi analisada pelo seu perfil de eluição em HPSEC-MALLS-RI (FIGURA 101), tendo sua massa molar ponderal média (M_w) estimada, através de curva padrão de dextrana, em $1,0 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$. Esta fração polissacarídica híbrida também teve seu perfil de eluição comparado com as duas frações precursoras, a Alg-Na e Alg-Dap (FIGURA 102). A fração híbrida apresentou um maior tempo de retenção (48,0 min), seguida da fração

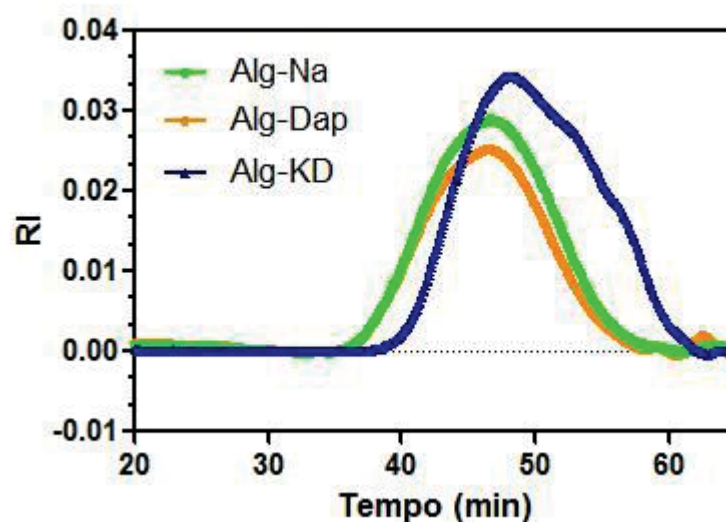
Alg-Dap (46,3 min) e da nativa Alg-Na (46,2 min), indicando que mesmo durante o processo produção do híbrido, houve depolimerização parcial da fração Alg-KD.

FIGURA 101 – HPSEC-MALLS-RI DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD



RI: *refractive index*; LS: *Laser-light scattering*. FONTE: O autor(2018).

FIGURA 102 – HPSEC DAS FRAÇÕES ALG-NA, ALG-DAP E DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD

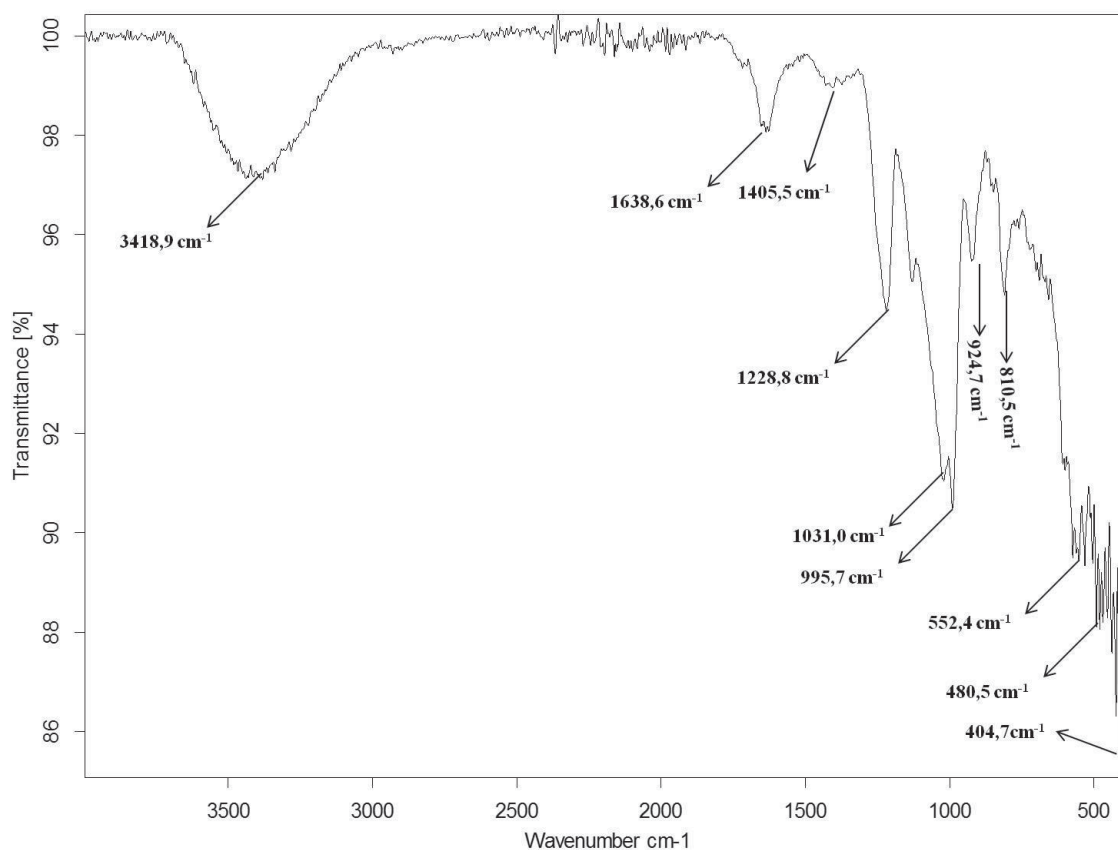


RI: *refractive index*. FONTE: O autor (2018).

No espectro de infravermelho da FIGURA 103, podem ser evidenciadas bandas características da carrabiose 4²-sulfato, principalmente as bandas em 924,7 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação C-O-C na unidade de 3,6-anidrogactose, em 810,5 cm⁻¹ o estiramento do grupo C-O-S na unidade de gactose, além da banda em 1228,8 cm⁻¹ ocasionada pelo

estiramento vibracional assimétrico do grupo sulfato ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$) (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003; SEKRAL; LEGRAND, 1993).

FIGURA 103 – ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DO POLISSA CARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD



Wavenumber: número de onda; Transmittance: transmitância. FONTE: O autor (2018).

4.2.6.2 Semissíntese de BM-KD1 e BM-KD2

Os blocos de ácido β -D-manurônico amidados (BM-Dap) foram submetidos a aminação redutiva utilizando o dissacarídeo carrabiose 4²-sulfato..

Na primeira condição de reação utilizou-se 2,5 mols de oligossacarídeo redutor, para cada 1 mol da fração amidada, que resultou na fração BM-KD1 (137,0% de rendimento). Já na segunda condição de reação, foi utilizado um excesso de 10 mols de oligossacarídeo redutor para cada 1 mol da fração amidada, gerando a fração BM-KD2 (169,0% de rendimento). Deste modo, variando apenas o excesso da fração KD no meio reacional, obtemos dois rendimentos de recuperação diferenciados, que podem indicar um maior percentual de ligações nitrogênio-carbono (N-C) acontecendo via aminação redutiva. Desta

forma foram realizadas as caracterizações químicas destas duas novas frações, a fim de esclarecer quais as diferenças químicas que apresentam.

Através da análise de RMN de HSQC-editado da fração BM-KD1 foi possível assinalar correlações já apresentadas na fração BM-Dap, além de novas correlações. O espectro de RMN de HSQC-editado da região anomérica (FIGURA 104 A), apresentou o sinal em 101,4/4,58 ppm, atribuído aos C1/H1 das unidades de β -D-ManAp 4-ligados e uma nova correlação anomérica em 104,2/4,42 ppm atribuída as unidades β -D-Galp 4-sulfato, da carrabiose 4²-sulfato.

Na região B da FIGURA 104, além das correlações referentes às unidades de β -D-ManAp, o espectro apresenta três correlações em fase negativa, referente a grupos -CH₂-, sendo elas atribuídas aos C6/H6 das unidades de β -D-Galp 4-sulfato (62,3/3,70 ppm) e 3,6-anidro-D-galactose (74,4/3,93 e 74,4/3,76 ppm).

Na fração BM-KD1, as correlações em 72,7/3,45, 72,7/3,64, 77,7/4,57 e 76,3/3,74 ppm foram atribuídas aos C2/H2, C3/H3, C4/H4 e C5/H5 das unidades de β -D-Galp 4-sulfato, enquanto as em 67,4/4,07, 85,2/3,81, 87,8/4,08 e 76,3/4,40 ppm aos C2/H2, C3/H3, C4/H4 e C5/H5 das unidades da 3,6-anidrogalactose, respectivamente. Estes sinais demonstraram que unidades de 3,6-anidrogalactose estão ligadas redutivamente aos blocos de ácido β -D-manurônico. Estes assinalamentos foram similares aos obtidos para a fração Alg-KD.

Após a aminação redutiva o espectro de HSQC-editado da fração BM-KD1 apresentou sinais invertidos em 51,2/3,17 ppm os quais foram atribuídos as C1/H1 das unidades de 3,6-anidro-D-galactose (COLODI, 2017; DUCATTI, 2009, ORSATO, 2007).

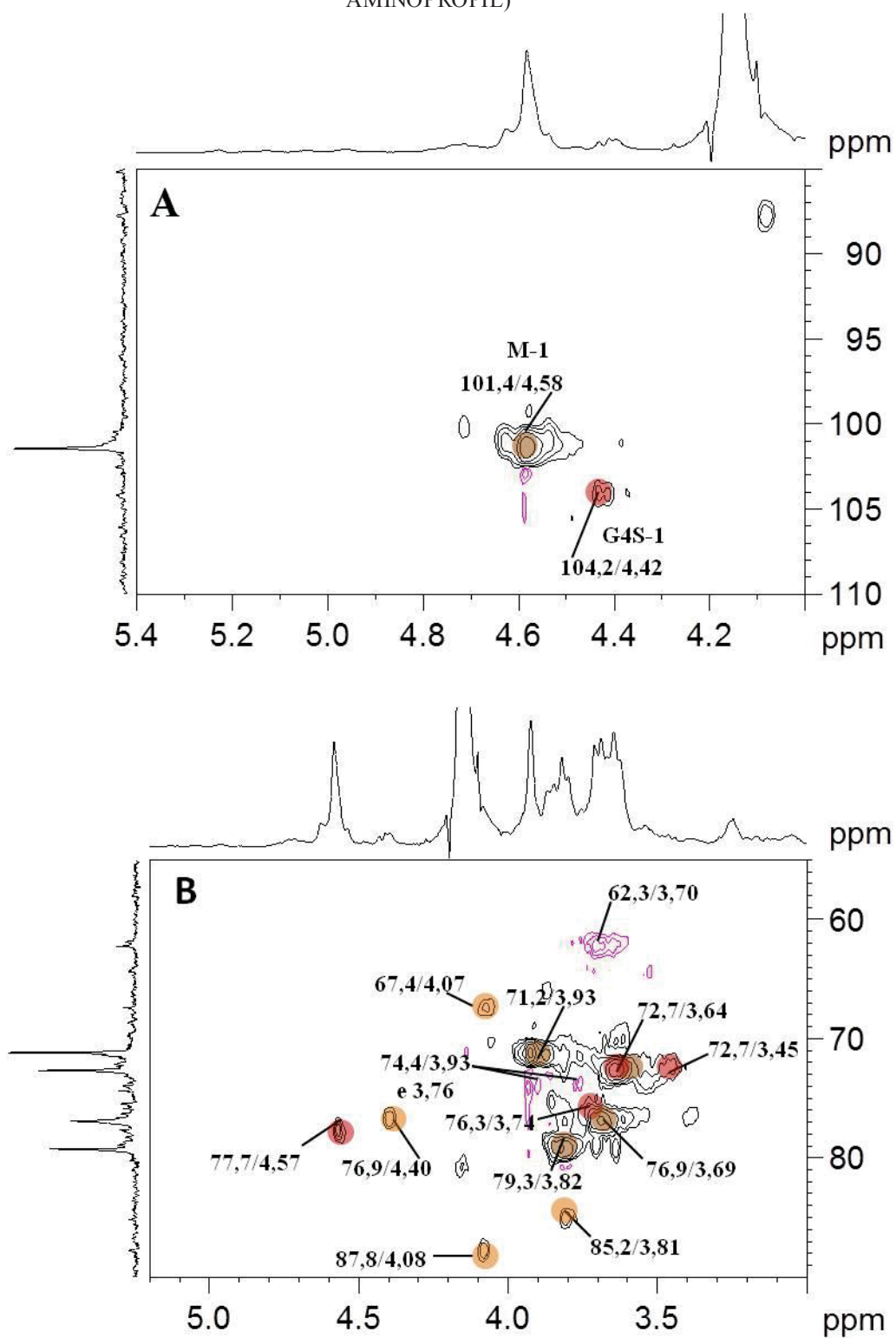
Nesta mesma FIGURA 104 (C), a correlação em 38,5/2,96 ppm refere-se ao C3' da extremidade livre do grupo *N*-(3-aminopropil), e a em 27,7/1,82 ppm atribuído ao C2' vizinho a esta extremidade C3' livre. Após a reação de aminação redutiva outras duas novas correlações, em 46,8/3,05 e 26,4/1,86 ppm, foram atribuídas aos C3'' e C2'', respectivamente. Estas duas novas correlações são resultados do deslocamento químico causado pela ligação covalente entre o dissacarídeo KD e o grupo *N*-propil. Estes assinalamentos estão de acordo com os reportados por ORSATO (2007), DUCATTI (2009) e COLODI (2017).

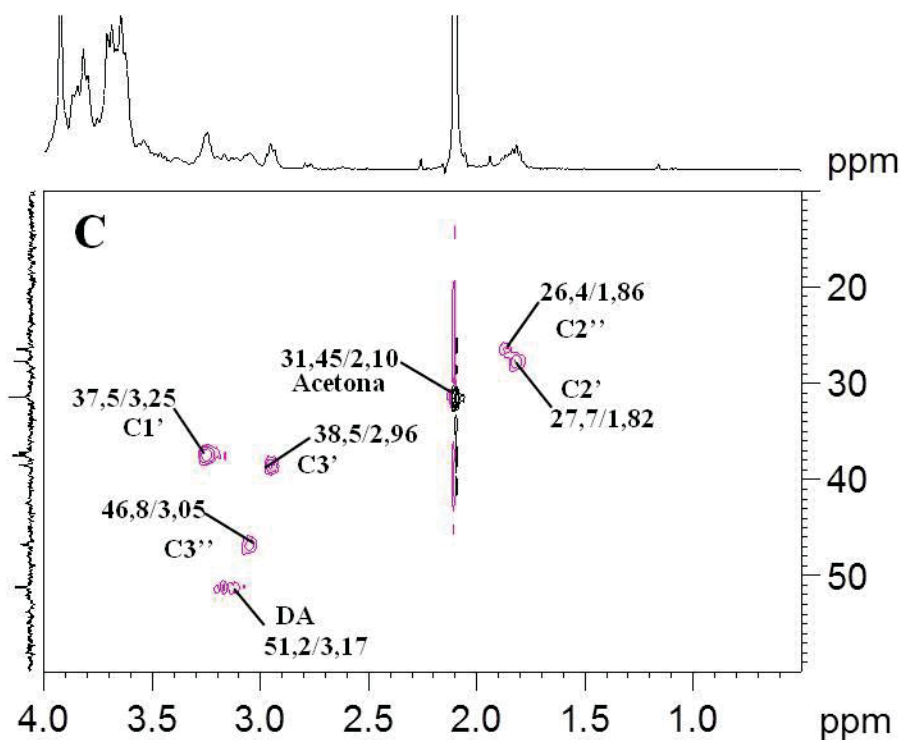
A integração das correlações de C3' e C3'' no espectro de HSQC-editado (não demonstrado), permitiu estimar que há aproximadamente 1 unidade de C3' para outra unidade C3''. Desta forma 53,8% das unidades de β -D-ManAp 4-ligadas (modificadas) estão apenas amidadas com a 1,3-propanodiamina, enquanto que 46,2% estão amidadas e aminadas redutivamente com o dissacarídeo KD.

Na TABELA 29, estão apresentados os assinalamentos das unidades constituintes do híbrido BM-KD1 (β -D-ManAp, β -D-Galp 4-sulfato, 3,6-anidrogactose) além da DAP. Destaca-se que as ressonâncias das carbonilas amidadas ou amidadas e aminadas com o KD não foram assinaladas.

A estrutura hipotética do polissacarídeo híbrido BM-KD1 está representada na FIGURA 105, constituída por uma cadeia principal de unidades ácido β -D-manurônico 4-ligadas, com inserções da 1,3-propanodiamina, com uma das extremidades amidadas nas carbonilas do polissacarídeo da cadeia principal, podendo ainda ter a sua outra extremidade substituída ou não por unidades dissacarídicas carrabiose.4²-sulfato.

FIGURA 104 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC-EDITADO DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD1
(A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO N-(3-AMINOPROPIL)





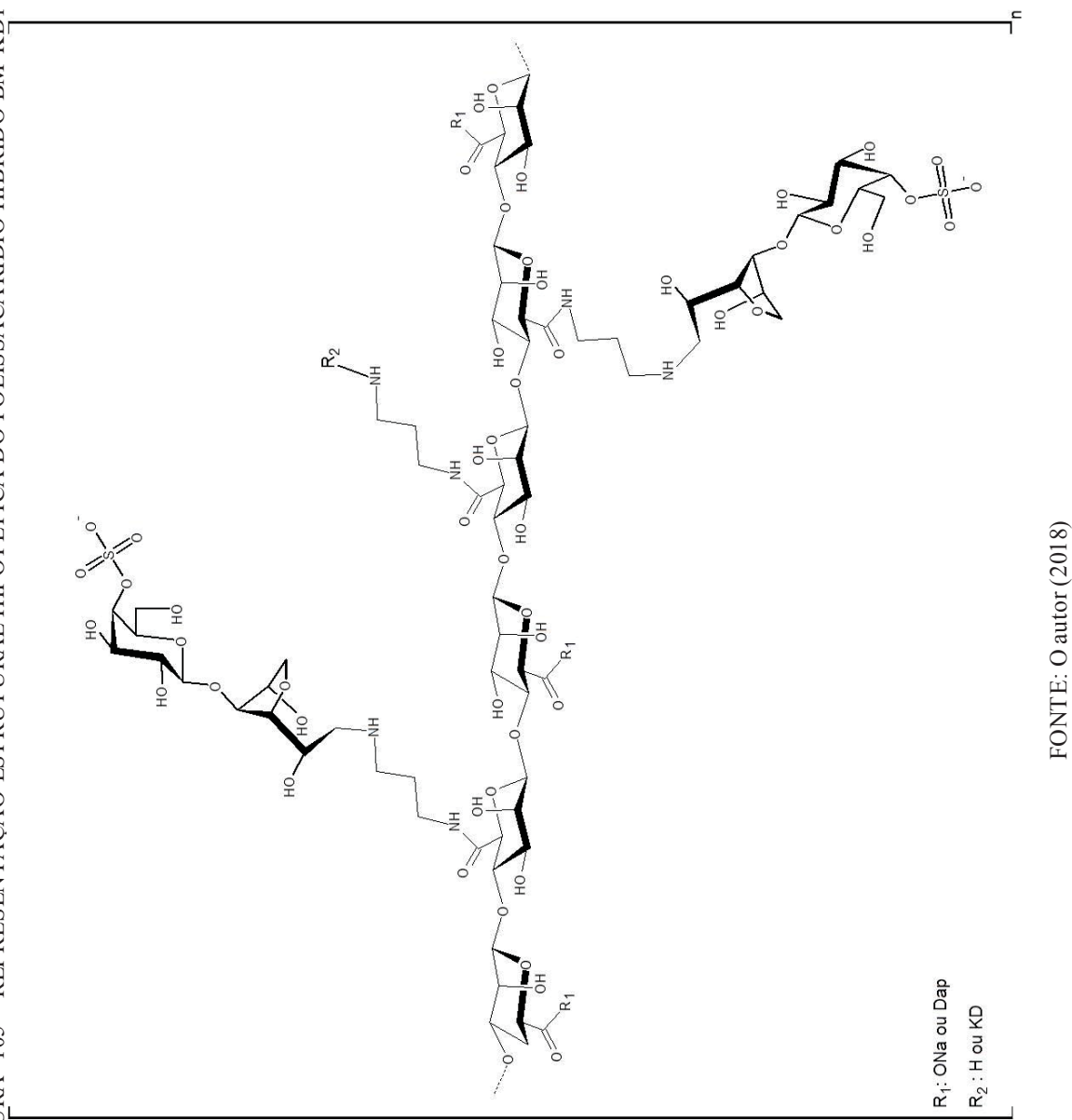
Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,10). M(●) e GS4 (●) e DA (●) representam os C/H das unidades de β-D-ManAp, β-D-Galp 4-sulfato e 3,6-anidrogactose, respectivamente. Enquanto que C1'-C3' e C2''-C3'' são referentes aos C/H do grupo *N*-(3-aminopropil), e N' ao produto secundário de amidação N-aciluréia e O-acilisouréia. FONTE: O autor (2018).

TABELA 27 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD1

Unidade	Sigla	^{13}C	^1H
[\rightarrow 4)- β -D-ManAp-(1 \rightarrow]	BM	1	101,4
		2	71,2
		3	72,7
		4	79,3
		5	76,9
		6	175,6
		6 [#]	n.d.
[\rightarrow β -D-Galp 4-sulfato-(1 \rightarrow]	G4S	1	104,2
		2	72,70
		3	72,7
		4	77,7
		5	76,3
		6	62,3
[\rightarrow 4)1-desoxi-3,6-anidro-D-galactose	DA	1	51,2
		2	67,4
		3	85,2
		4	87,8
		5	76,3
		6	74,4
N'-N-propil	DAP	C1'	37,5
		C2'	27,7
		C2''	26,4
		C3'	38,5
		C3''	46,8

n.d.=não determinado. BM corresponde a unidades de β -D-ManAp ligadas através de ligações (1 \rightarrow 4); G4S, DA e DAP correspondem a unidades de β -D-galactose 4-sulfato, 3,6-anidro-galactose e 1,3-propanodiamina, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 105 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL HIPOTÉTICA DO POLISSACARÍDIO HÍBRIDO BM-KDI



FONTE: O autor (2018)

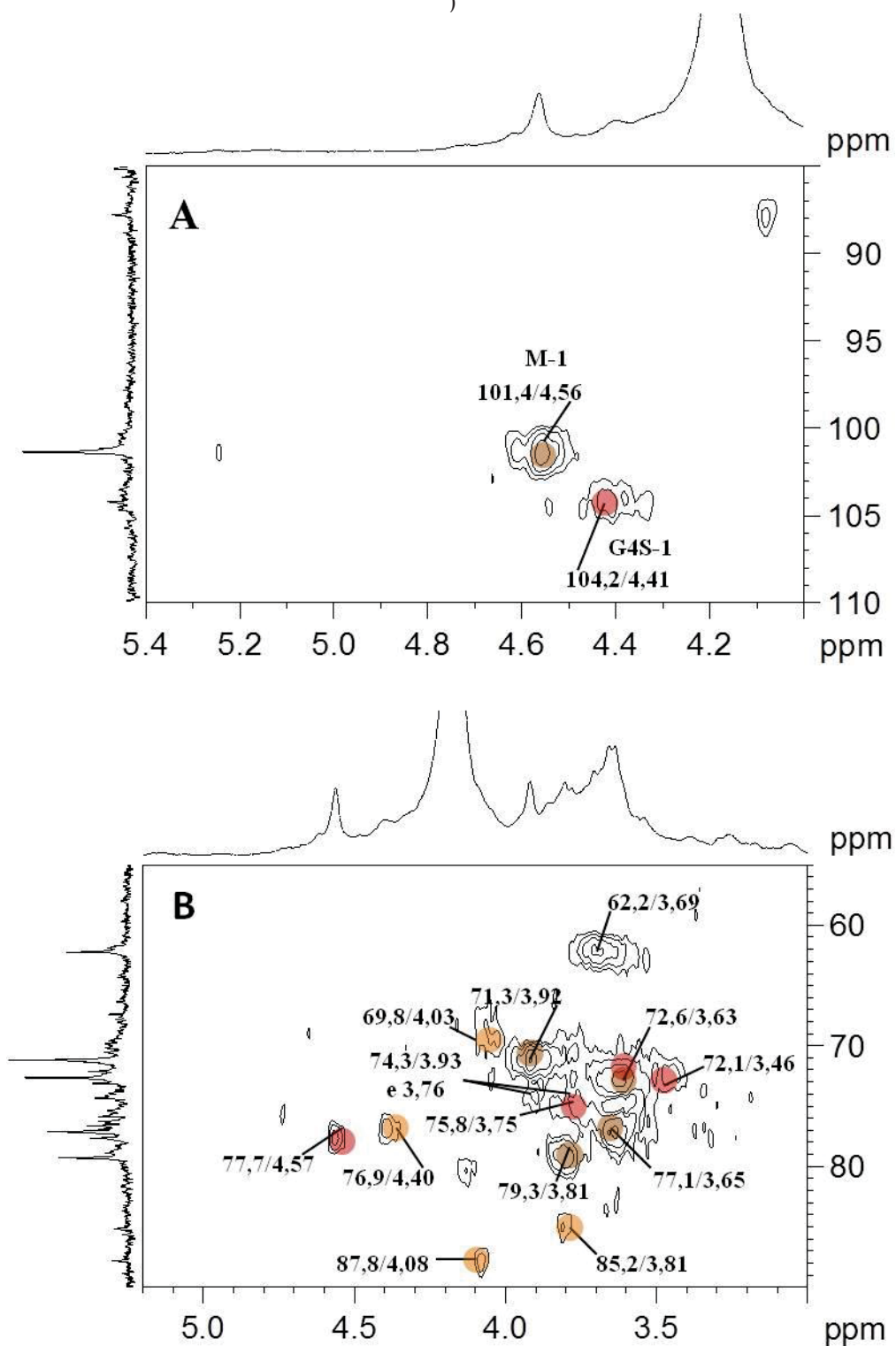
O espectro de RMN de HSQC na região de carboidratos da fração BM-KD2 (FIGURA 106 A), é muito similar ao espectro de da fração BM-KD1, sendo assinalado os sinais das unidades de β -D-ManAp, β -D-Galp 4-sulfato e das unidades de 3,6-anidrogactose (C1/H1 em 51,2/3,17 ppm).

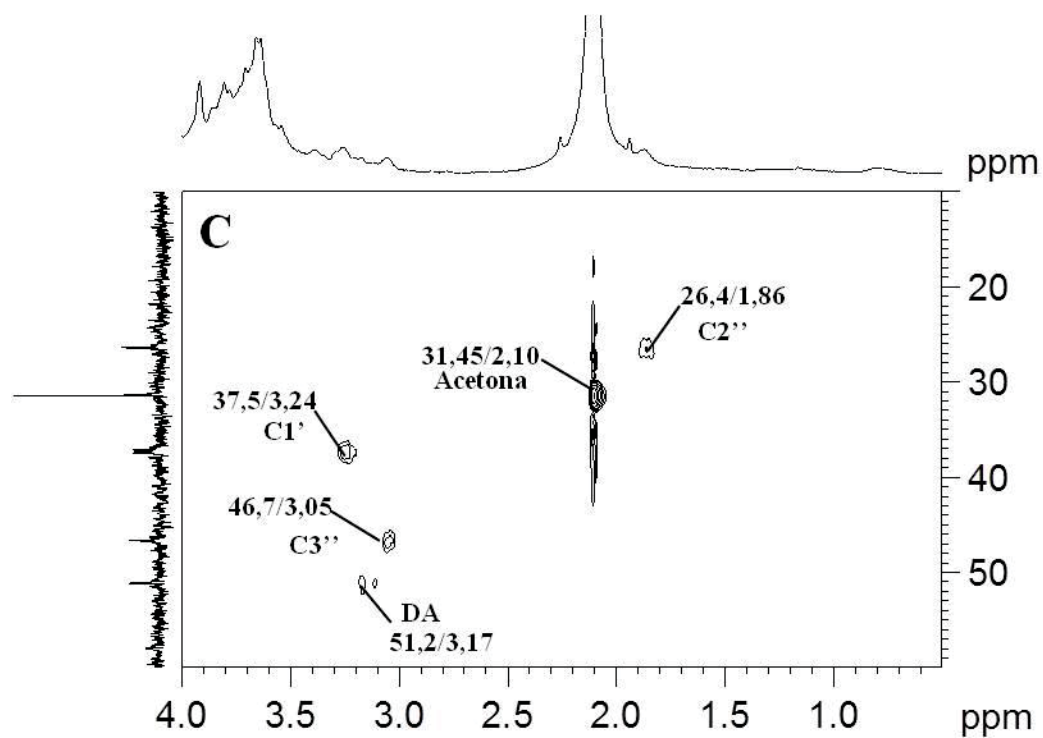
A região C da FIGURA 106, apresenta as correlações e em 46,7/3,05 e 26,4/1,86 ppm referentes aos C3'' e C2'' do grupo *N*-(3-aminopropil) quando ligada a carrabiose 4²-sulfato. Este resultado juntamente com a ausência dos sinais em 38,5/2,96 e 27,7/1,82 ppm (presentes na fração BM-KD1) indica que todas unidades modificadas via amidação, estão também aminadas redutivamente com a carrabiose 4²-sulfato, na fração BM-KD2.

Na TABELA 30, está demonstrado os assinalamentos das unidades constituintes da fração BM-KD2. Da mesma maneira que na fração BM-KD1, a carboxila amidada substituída pelo KD, não foi assinalada no espectro de RMN de ¹³C.

A estrutura hipotética do polissacarídeo híbrido BM-KD2 está representada na FIGURA 107, como sendo constituído por uma cadeia principal de unidades ácido β -D-manurônico 4-ligadas, com inserções da 1,3-propanodiamina, a qual apresenta uma das extremidades amidadas nas carbonilas do polissacarídeo da cadeia principal, e a outra aminada com a carrabiose 4²-sulfato.

FIGURA 106 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD2 (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO *N*-(3-AMINOPROPIL)





Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,10). M(●) e GS4 (●) e DA (●) representam os C/H das unidades de $\beta\text{-D-ManAp}$, $\beta\text{-D-Galp}$ 4-sulfato e 3,6-anidrogactose, respectivamente. Enquanto que C1', C2'' e C3'' são referentes aos C/H do grupo N-(3-aminopropil), respectivamente. FONTE: O autor (2018).

TABELA 28 – ASSINALAMENTOS DOS $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD2

Unidade	Sigla	^{13}C	^1H
[\rightarrow 4)- β -D-ManAp-(1 \rightarrow]	BM	1	101,4
		2	71,3
		3	72,6
		4	79,3
		5	77,1
		6	175,8
		6 [#]	n.d.
[\rightarrow β -D-Galp 4-sulfato-(1 \rightarrow]	G4S	1	104,2
		2	72,1
		3	72,6
		4	77,7
		5	75,8
		6	62,2
[\rightarrow 4)-1-desoxi-3,6-anidro-D-galactose	DA	1	51,2
		2	69,8
		3	85,2
		4	87,8
		5	76,9
		6	74,3
N'N'-propil	DAP	C1'	37,5
		C2'	-
		C2''	26,4
		C3'	-
		C3''	46,7

n.d.=não determinado. BM corresponde a unidades de β -D-ManAp ligadas através de ligações (1 \rightarrow 4); G4S, DA e Dap correspondem a unidades de β -D-galactose 4-sulfato, 3,6-anidro-galactose e 1,3-propanodiamina, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

Foram realizadas as determinações de N e C total para as frações híbridas BM-KD1 e BM-KD2, como em suas precursoras (Bloco BM, BM-Dap, *kappa*-carragenana e KD) como descrito na TABELA 31.

Analisando a TABELA 35, é observado a diminuição do percentual de nitrogênio nas frações BM-KD1 e BM-KD2, quando comparadas a fração BM-Dap. Entretanto, as determinações de sulfato através do método descrito por DODGSON (1961) não puderam ser realizadas devido à interferência detectada, pela transformação das moléculas em ácidos e consequentemente causando precipitação, interferindo na leitura da turbidimetria.

Entretanto correlacionando os resultados obtidos pelas análises de RMN das frações BM-KD1 e BM-KD2, juntamente com esta maior diminuição do teor de nitrogênio da fração BM-KD2, confirma-se que ocorreu uma maior substituição do dissacarídeo na fração BM-KD2 como já descrito anteriormente.

TABELA 29 – DOSAGEM DE CARBONO E NITROGÊNIO NOS POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS MB-KD1 MB-KD2 E SEUS PRECURSORES.

Fração	N (%)	C (%)	DA (mol %)
K	0,35	24,76	-
Bloco BM	0,08	36,19	-
BM-Dap	1,91	32,93	16,1
BM-KD1	1,79	33,61	-
BM-KD2	1,70	34,17	-

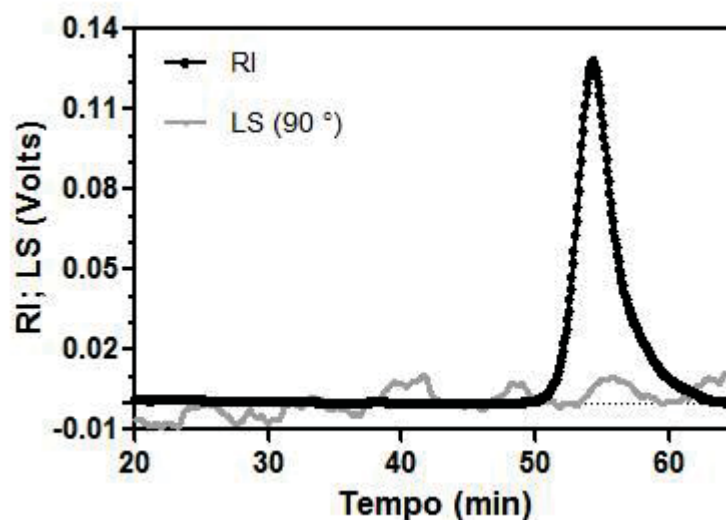
N e C correspondem respectivamente aos percentuais de nitrogênio e carbono. DA é o grau de substituição de amino a cada 1 mol. FONTE: O autor (2018)..

Corroborando os resultados das análises de RMN e das determinações de N e C foi observado que ao utilizar um excesso de 2,5 mols de KD em relação a fração BM-Dap, não foi obtido total substituição das unidades amidadas com o KD. Entretanto, quando o excesso de KD foi aumentado 4 vezes (10 mols), ocorreu substituição de 100% das unidades amidadas dos ácidos urônicos da fração BM-Dap. Desta forma uma quantidade maior de KD, melhora o rendimento de substituição dos grupos *N*-(3-aminopropil) via aminação redutiva. Estes resultados indicam que uma maior quantidade de unidades aldeídicas no meio melhora o rendimento reacional de aminação redutiva devido a maior quantidade do dissacarídeo com relação ao Bloco BM, deslocando o equilíbrio da reação.

As frações polissacarídicas BM-KD1 e BM-KD2 foram analisadas por HPSEC-MALLS-RI (FIGURAS 108 e 109, respectivamente), e tiveram suas massas molares

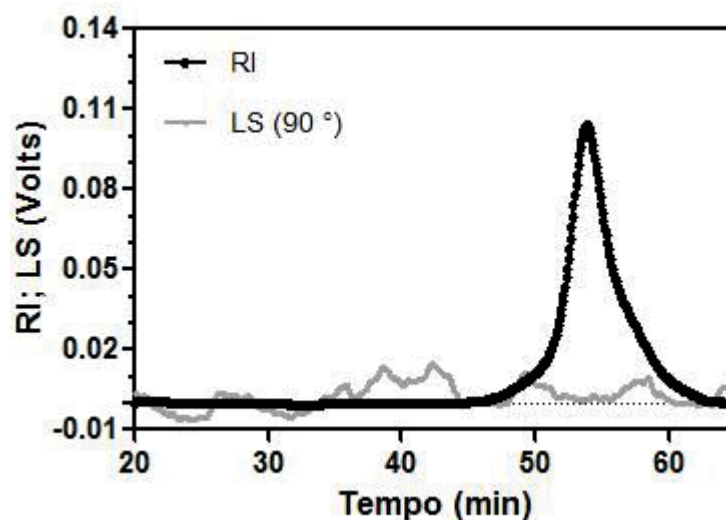
ponderais médias (M_w) estimada em $8,6 \times 10^3$ e $9,9 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$, respectivamente. Esta diminuição do M_w na fração BM-KD1 mesmo durante a reação de amidação reductiva, após a inserção do dissacarídeos ao bloco BM-Dap, pode estar ocorrendo devido ao processo de degradação parcial do polissacarídeo, devido as condições reacionais (levemente ácidas pH 5-6 a 55 °C). Enquanto na fração BM-Dap ocorreu um aumento da massa, devido ao maior grau de substituição de KD, e possivelmente uma menor degradação do polissacarídeo.

FIGURA 108 – HPSEC-MALLS-RI DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD1



RI: *refractive index*; LS: *Laser-light scattering*. FONTE: O autor (2018).

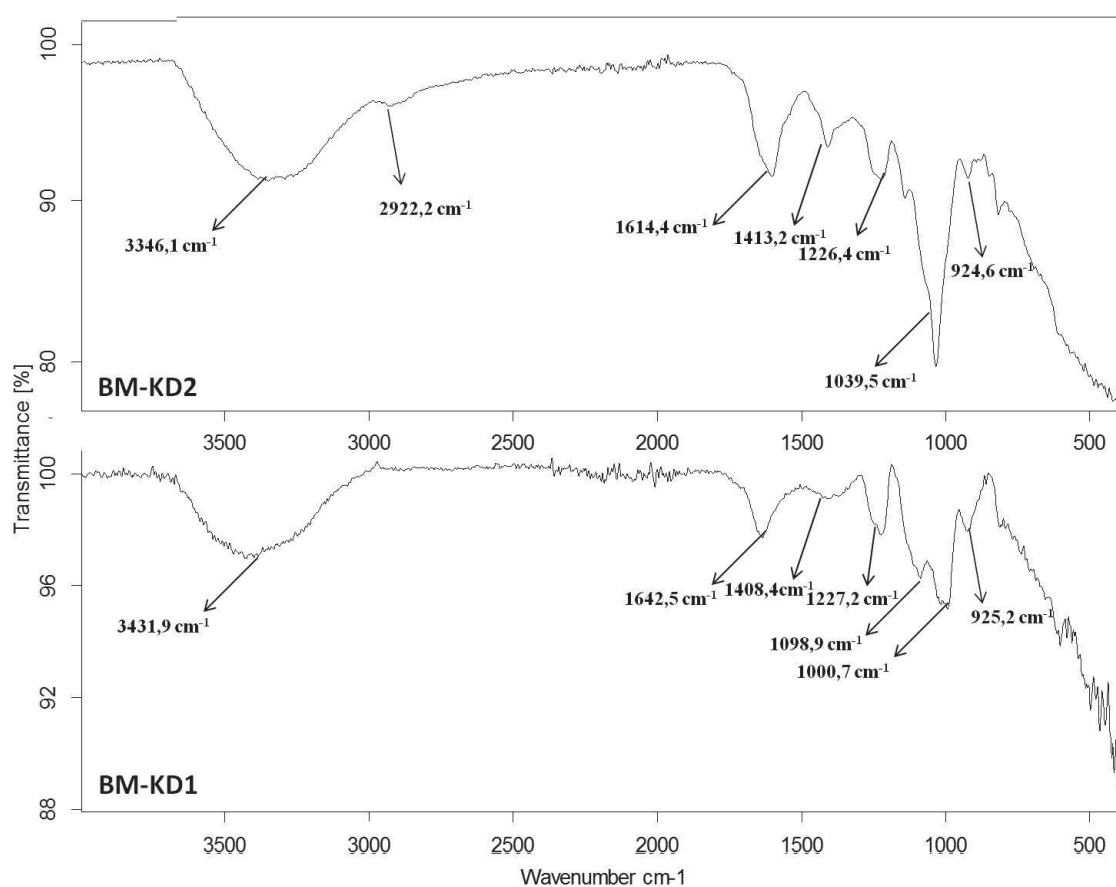
FIGURA 109 – HPSEC-MALLS-RI DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD2



RI: *refractive index*; LS: *Laser-light scattering*. FONTE: O autor (2018).

Os espectros de infravermelho das frações dos oligossacarídeos híbridos BM-KD1 e BM-KD2 são similares e estão apresentados na FIGURA 110. Em ambas as frações ocorre o aparecimento de bandas na região de $924,6 - 925,2 \text{ cm}^{-1}$ e $1226,4 - 1227,2 \text{ cm}^{-1}$ referentes ao estiramento da ligação O-C-O em unidades de 3,6-anidrogactose e ao estiramento vibracional assimétrico do grupo sulfato ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$), respectivamente. Estas duas faixas são características de grupos químicos pertencentes a unidade *carrabiose* 4²-sulfato (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003; SEKRAL; LEGRAND, 1993).

FIGURA 110 – ESPECTROS DE INFRA VERMELHO DAS FRAÇÕES DOS POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS BM-KD2 E BM-KD1



Wavenumber: número de onda; Transmittance: transmitância. FONTE: O autor (2018).

4.2.6.3 Semissíntese de BG-KD1 e BG-KD2

As frações BG-KD foram obtidas a partir da reação de aminação reductiva da fração BG-Dap e KD. Similar a produção dos polissacarídeos híbridos BM-KD, foram utilizadas duas condições para produção do oligossacarídeo híbrido BM-KD. Na primeira condição de reação utilizou-se 2,5 mols de oligossacarídeo redutor, para cada 1 mol da fração amidada,

que resultou na fração BG-KD1 com um rendimento de recuperação de 128,0%. Já na segunda condição de reação foi utilizado um excesso de 10 mols de oligossacarídeo redutor para cada 1 mol da fração amidada, gerando a fração BG-KD2 com rendimento de 180,0%.

Desta forma foram realizadas as caracterizações químicas destas duas novas frações, a fim de esclarecer quais as diferenças químicas que apresentam. Através da análise de RMN de HSQC-editado da fração BG-KD1 foi possível assinalar correlações já apresentadas na fração BG-Dap, além de novas correlações.

O espectro de RMN de HSQC-editado da região anomérica (FIGURA 111 A), apresentou as correlações em 101,9/4,95 e 101,6/5,04 ppm atribuídas aos C1/H1 das unidades de α -L-GulAp 4-ligados e α -L-GulAp amidados 4-ligados, respectivamente, a nova correlação anomérica em 104,1/4,42 ppm foi atribuída as unidades β -D-Galp 4-sulfato, da carrabiose 4²-sulfato.

Na região B da FIGURA 111, além das correlações referentes às unidades de α -L-GulAp, o espectro apresenta três correlações em fase negativa, referente a grupos -CH₂-, sendo elas atribuídas aos C6/H6 das unidades de β -D-Galp 4-sulfato (62,2/3,70 ppm) e 3,6-anidro-D-galactose (74,4/3,91 e 74,4/3,77 ppm).

Na fração BG-KD1, as correlações em 72,2/3,46, 72,7/3,67, 77,7/4,57 e 75,9/3,72 ppm foram atribuídas aos C2/H2, C3/H3, C4/H4 e C5/H5 da unidades de β -D-Galp 4-sulfato, e as em 67,7/4,07, 85,2/3,81, 87,8/4,08 e 76,6/4,40 ppm aos C2/H2, C3/H3, C4/H4 e C5/H5 das unidades da 3,6-anidrogactose, respectivamente. Estes sinais são similares aos determinados para as fração Alg-KD, BM-KD1 e BM-KD2, demonstrando que unidades de 3,6-anidrogactose estão ligadas redutivamente aos blocos de ácido α -L-gulurônico.

De forma semelhante as frações híbridas já caracterizadas, o C/H do terminal redutor do dissacarídeo KD ao se ligar na amina redutivamente, desloca de 91,4/4,91 ppm para 51,2/3,15 ppm, como observado na FIGURA 111 (C), a correlação referente ao C1/H1 da 3,6-anidrogactose em fase negativa. Este assinalamento foi confirmado pela análise de RMN homonuclear de COSY ¹H-¹H (ANEXO 12, pg. 336), onde o hidrogênio H1 (3,15 ppm) correlaciona-se com H2 (4,07 ppm), das unidades de 3,6-anidrogactose.

Nesta mesma FIGURA 111 (C), as correlações observadas já foram assinaladas anteriormente nos híbridos Alg-KD e BM-KD. A correlação em 38,3/2,93 ppm refere-se ao C3' da extremidade livre do grupo N-(3-aminopropil), e em 27,7/1,81 ppm foi atribuída ao C2' vizinho a esta extremidade C3' livre. Duas novas correlações surgiram após a reação de aminação redutiva em 46,9/3,03 e 26,5/1,86 ppm, atribuídas aos C3'' e C2'',

respectivamente. Estas novas correlações são resultados do deslocamento químico causado pela inserção do dissacarídeo ao grupo *N*-propil. Estes assinalamentos estão de acordo com os reportados por ORSATO (2007), DUCATTI (2009) e COLODI (2017).

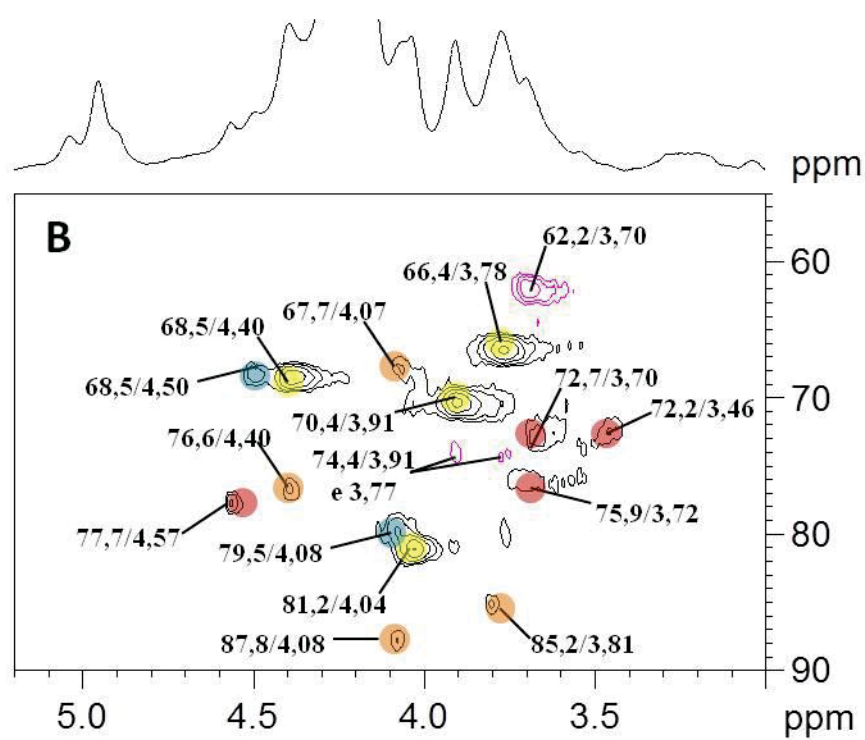
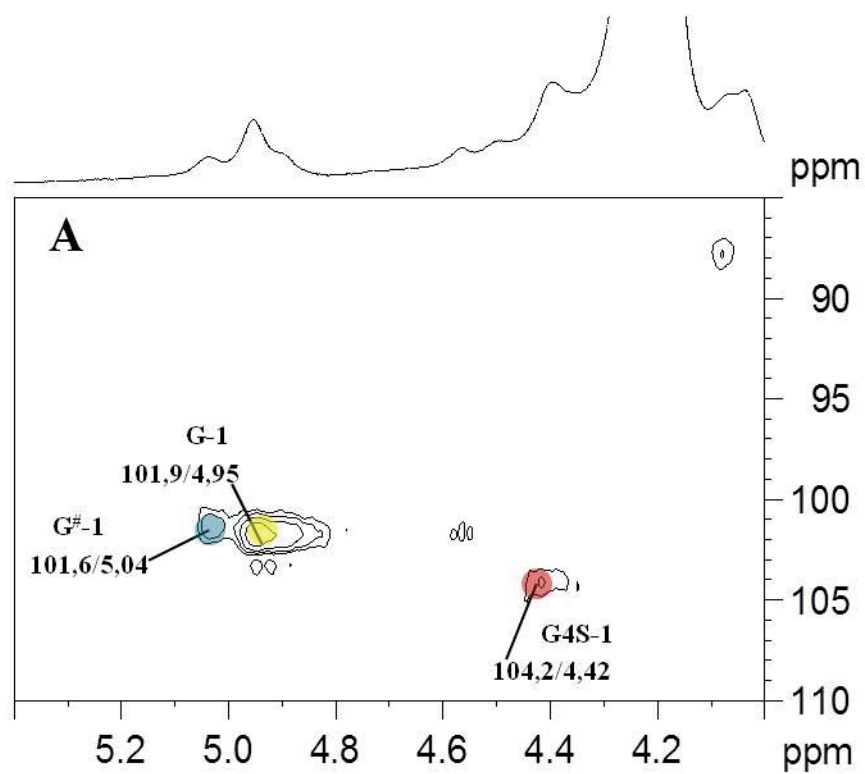
Além dos assinalamentos das unidades da carrabiose 4²-sulfato, foram identificadas as correlações em 66,4/3,78, 70,4/3,91, 81,2/4,04 e 68,5/4,40 ppm, atribuídas aos C2/H2, C3/H3, C4/H4 e C5/H5, respectivamente das unidades de α -L-GulAp sem modificação. As correlações em 79,5/4,08 e 68,5/4,50 ppm foram atribuídas respectivamente ao C4/H4 e C5/H5 das unidades de α -L-GulAp amidado com a DAP.

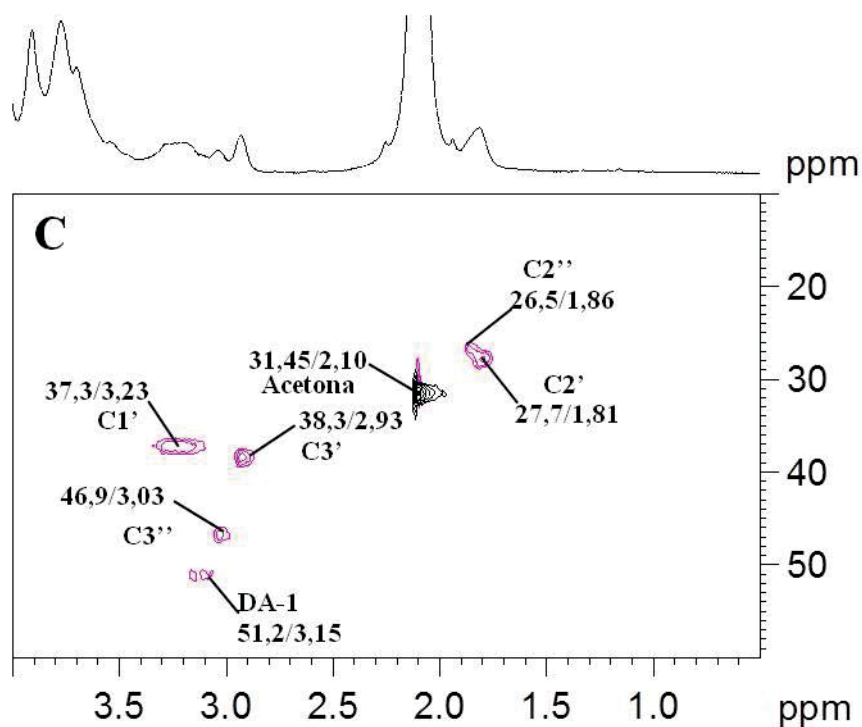
Como nos outros polissacarídeos híbridos, a integração das correlações de C3' e C3'' no espectro de HSQC-editado (não demonstrado), permitiu estimar que há aproximadamente 2 unidades de C3' para 1 unidade C3''. Desta forma 64,9% das unidades de α -L-GulAp 4-ligadas (modificadas) estão apenas amidadas com a 1,3-propanodiamina, enquanto que 35,1% estão amidadas e aminadas redutivamente com o dissacarídeo KD.

Na TABELA 30, estão apresentados os assinalamentos das unidades constituintes do híbrido BG-KD1 (α -L-GulAp, β -D-Galp 4-sulfato, 3,6-anidrogactose) além da DAP. Destaca-se que as ressonâncias das carbonilas amidadas ou amidadas e aminadas com o KD não foram assinaladas.

A estrutura hipotética do polissacarídeo híbrido BG-KD1 está representada na FIGURA 112, constituída por uma cadeia principal de unidades ácido α -L-gulurônico 4-ligadas, com inserções da 1,3-propanodiamina, com uma das extremidades amidadas nas carbonilas do polissacarídeo da cadeia principal, podendo ainda ter a sua outra extremidade substituída ou não por unidades dissacarídicas carrabiose 4²-sulfato.

FIGURA 111 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC-EDITADO DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD1
(A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO *N*-(3-AMINOPROPIL)





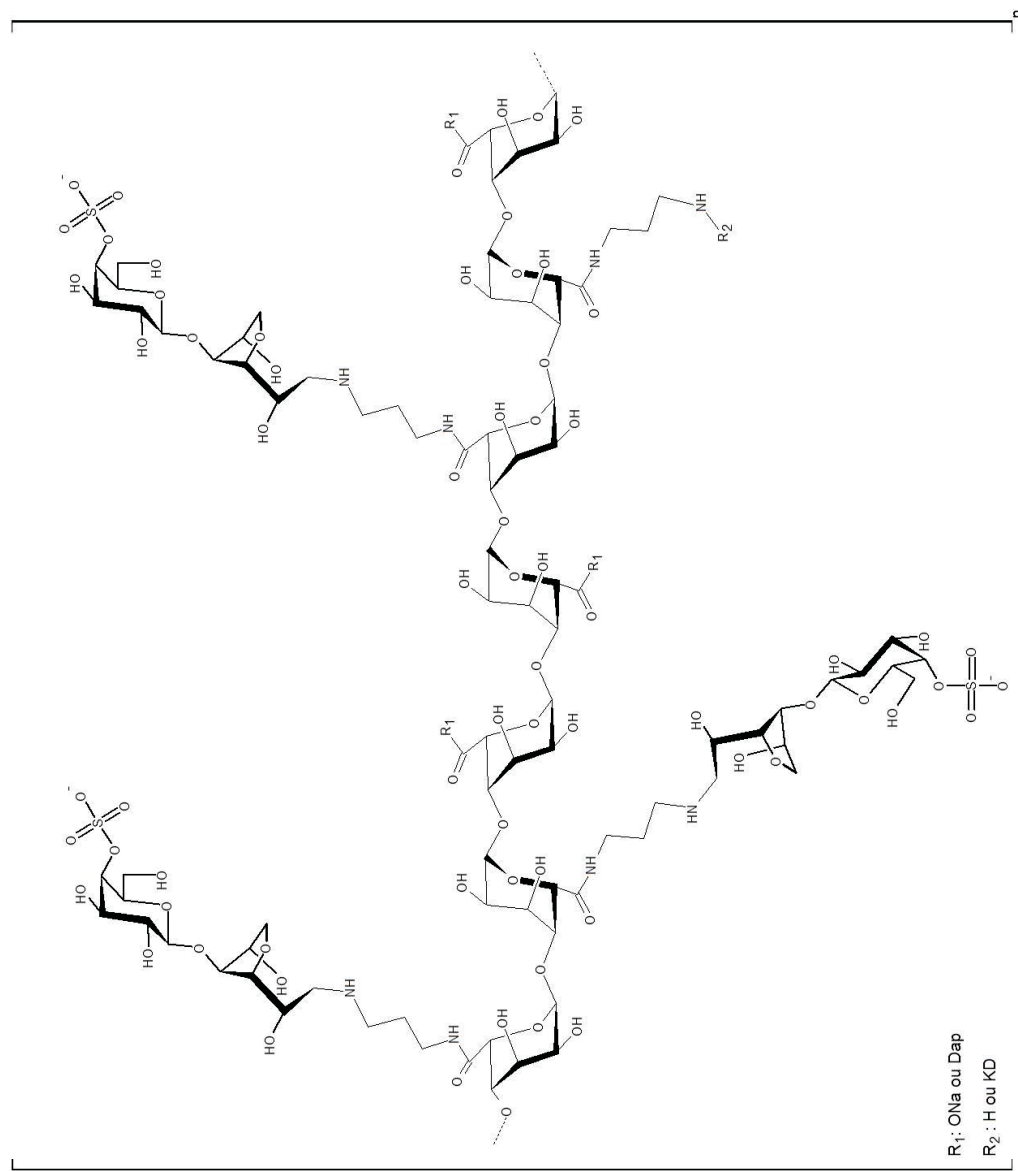
Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,10). G (●), G[#] (●), GS4 (●) e DA (●) representam os C/H das unidades de α-L-GulAp, α-L-GulAp amidada com a DAP, β-D-Galp 4-sulfato e 3,6-anidrogactose, respectivamente. Enquanto que C1' - C3' e C2'' - C3'' são referentes aos C/H do grupo N-(3-aminopropil). FONTE: O autor (2018).

TABELA 30 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD1

Unidade	Sigla	C	H
[\rightarrow 4)- α -L-GulAp -(1 \rightarrow]	BG	1	101,9
		1 [#]	101,6
		2	66,4
		3	70,4
		4	81,2
		4 [#]	79,5
		5	68,5
		5 [#]	68,3
		6	-
		6 [#]	-
[\rightarrow β -D-Galp 4-sulfato-(1 \rightarrow]	G4S	1	104,2
		2	72,2
		3	72,7
		4	77,7
		5	75,9
		6	62,2
[\rightarrow 4)-1-desoxi-3,6-anidro-D-galactose	DA	1	51,2
		2	67,7
		3	85,2
		4	87,8
		5	76,6
		6	74,4
<i>N'N'</i> -propil	DAP	C1'	37,3
		C2'	27,7
		C2''	26,5
		C3'	38,3
		C3''	46,9

n.d.=não determinado. Bloco BG corresponde a unidades de α -L-GulAp (1-6), α -L-GulAp amidada com DAP (1[#] - 6[#]) ligadas através de ligações (1 \rightarrow 4); G4S, DA e DAP correspondem a unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato, 3,6-anidrogallactose e 1,3-propanodiamina, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 112 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL HIPOTÉTICA DO POLISSACARÍDIO HÍBRIDO BG-KD1



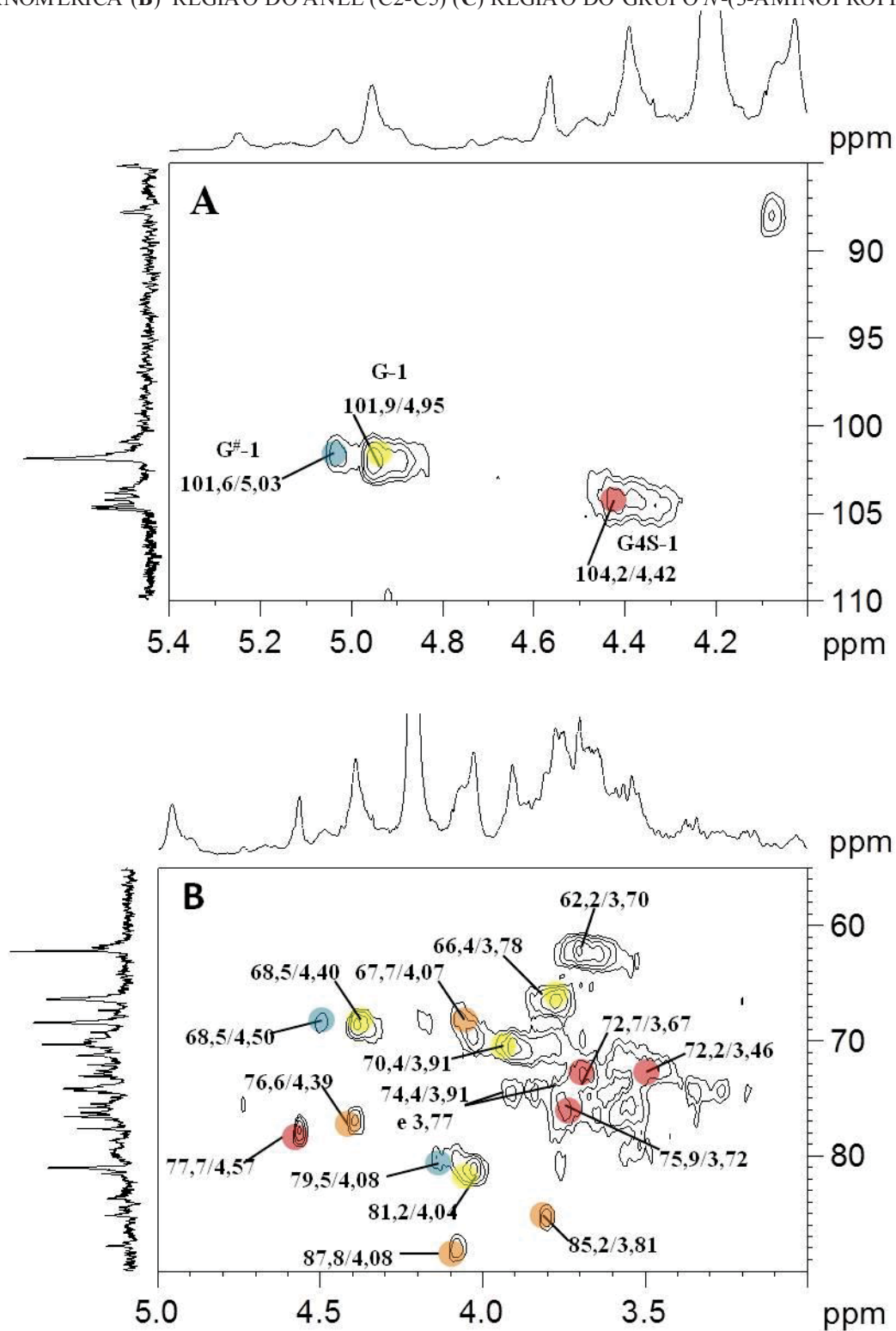
FONTE: O autor (2018).

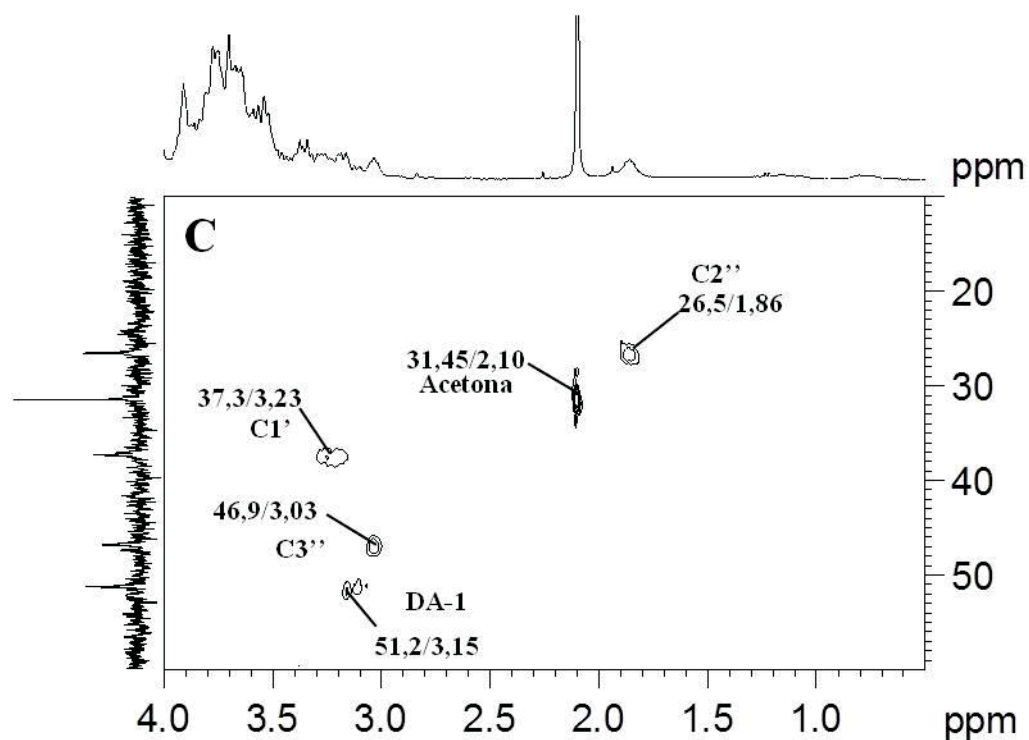
O espectro de RMN de HSQC na região de carboidratos da fração BG-KD2 (FIGURA 113 **A** e **B**), é muito similar ao espectro de da fração BG-KD1, sendo assinalado os sinais das unidades α -L-GulAp e α -L-GulAp amidada, bem como as unidades da β -D-Galp 4-sulfato e da 3,6-anidrogactose. Entretanto, a região **C** do espectro de RMN (FIGURA 113) se diferencia do espectro de RMN da fração BG-KD1, devido a ausência de duas correlações, 38,3/2,93 e 27,7/1,81 ppm, apresentando somente as correlações em 37,3/3,23, 26,5/1,86 e 46,9/3,03 ppm referentes aos C1'',C2'' e C3'' do grupo *N*-(3-aminopropil) quando ligado a carrabiose 4²-sulfato. Este assinalamento indica que todas unidades modificadas via amidação, estão também aminadas redutivamente com a carrabiose 4²-sulfato, na fração BG-KD2.

Na TABELA 31, está demonstrado os assinalamentos das unidades constituintes da fração BG-KD2. E da mesma maneira que na fração BG-KD1, a carboxila amidada substituída pelo KD não foi assinalada no espectro de RMN de ¹³C.

A estrutura hipotética do polissacarídeo híbrido BG-KD2 está representada na FIGURA 114, como sendo constituído por uma cadeia principal de unidades ácido α -L-gulurônico 4-ligadas, com inserções da 1,3-propanodiamina, a qual apresenta uma das extremidades amidadas em C6 do polissacarídeo da cadeia principal, e a outra aminada com a carrabiose 4²-sulfato.

FIGURA 113 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD2 (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C5) (C) REGIÃO DO GRUPO *N*-(3-AMINOPROPIL)





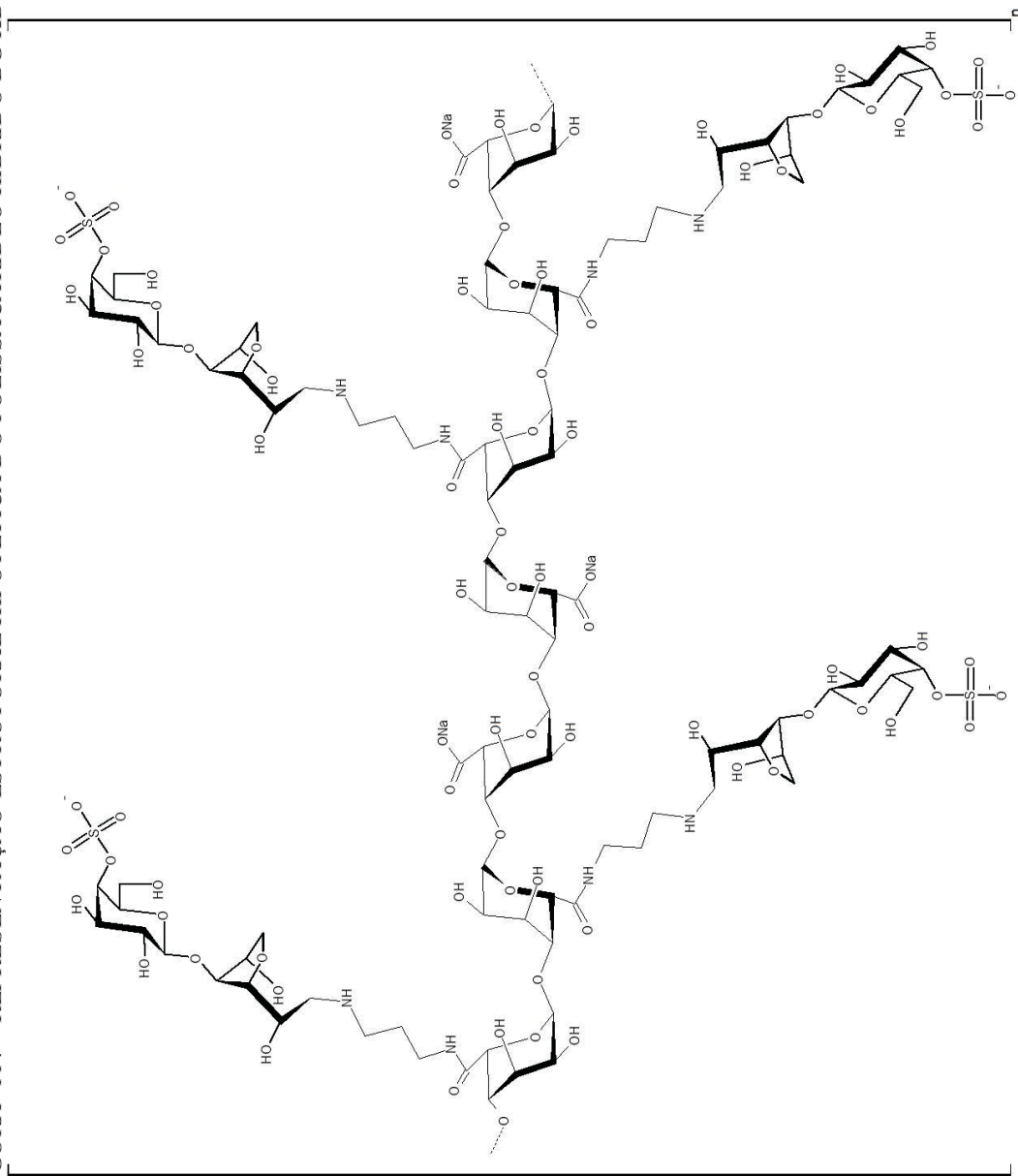
Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,10). G (●), G[#] (●), GS4 (●) e DA (●) representam os C/H das unidades de α-L-GulAp, α-L-GulAp amidada com a DAP, β-D-Galp 4-sulfato e 3,6-anidrogactose, respectivamente. Enquanto que C1''- C3'' são referentes aos C/H do grupo N-(3-aminopropil).
 FONTE: O autor (2018).

TABELA 31 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES CONSTITUINTES DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD2

Unidade	Sigla	^{13}C	^1H
[\rightarrow 4)- α -L-GulAp -(1 \rightarrow]	BG	1	101,9
		1 [#]	101,6
		2	66,6
		3	70,4
		4	81,2
		4 [#]	79,5
		5	68,5
		5 [#]	68,5
		6	-
		6 [#]	-
[\rightarrow β -D-Galp 4-sulfato-(1 \rightarrow]	G4S	1	104,2
		2	72,2
		3	72,7
		4	77,7
		5	75,9
		6	62,2
[\rightarrow 4)-1-desoxi-3,6-anidro-D-galactose	DA	1	51,2
		2	67,7
		3	85,2
		4	87,8
		5	76,6
		6	74,4
<i>N,N'</i> -propil	DAP	C1'	37,3
		C2'	-
		C2''	26,5
		C3'	-
		C3''	46,9

n.d.=não determinado. Bloco BG corresponde a unidades de α -L-GulAp (1-6), α -L-GulAp amidada com a DAP (1[#] - 6[#]) ligadas através de ligações (1 \rightarrow 4); G4S, DA e Dap correspondem a unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato, 3,6-anidrogalaactose e 1,3-propanodiamina, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

FIGURA 114 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL HIPOTÉTICA DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD2



FONTE: O autor (2018).

Foram realizadas as determinações de N e C total, além dos teores de sulfato e enxofre tanto para as frações híbridas BG-KD1 e BG-KD2, como em suas precursoras (bloco BG, BM-Dap, *kappa*-carragenana e KD) como descrito na TABELA 32.

Analisando a TABELA 32, é observado o mesmo comportamento que para as frações híbridas Alg-KD e BM-KD, uma diminuição do percentual de nitrogênio nas frações BM-KD1 e MB-KD2, quando comparadas a fração BM-Dap. E de modo semelhante as determinações dos teores de sulfato não foram realizadas devido a interferência no método de DODGSON (1961).

TABELA 32 DOSAGEM DE CARBONO E NITROGÊNIO NOS POLISSACARÍDEOS HÍBRIDOS BG-KD1 BG-KD2 E SEUS PRECURSORES.

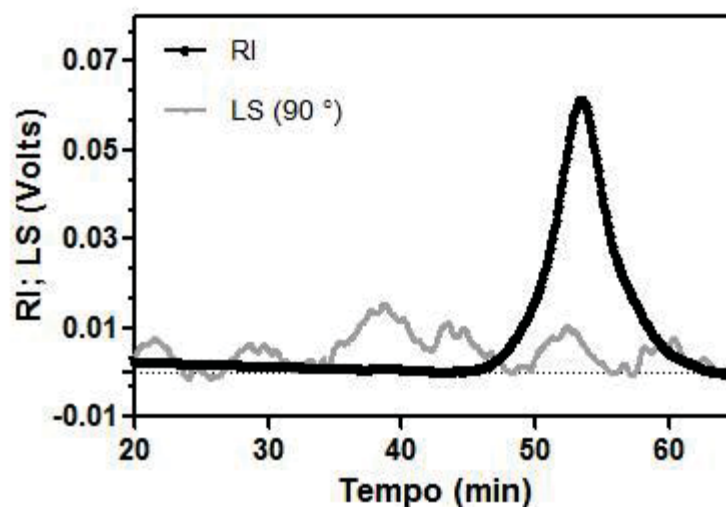
Fração	N (%)	C (%)	DA (mol%)
K	0,35	24,76	-
Bloco BG	0,058	30,66	-
BG-Dap	2,66	34,64	21,8
BG-KD1	2,26	34,88	-
BG-KD2	1,92	36,39	-

N e C correspondem respectivamente aos percentuais de nitrogênio e carbono. DA é o grau de substituição de amino a cada 1 mol. FONTE: O autor (2018).

Foi observado um comportamento similar as reações dos polissacarídeos híbridos BM-KD, onde um maior excesso (mols) de KD favore a reação de aminação redutiva, sendo 100% das amidas substituídas pela carrabiose 4²-sulfato.

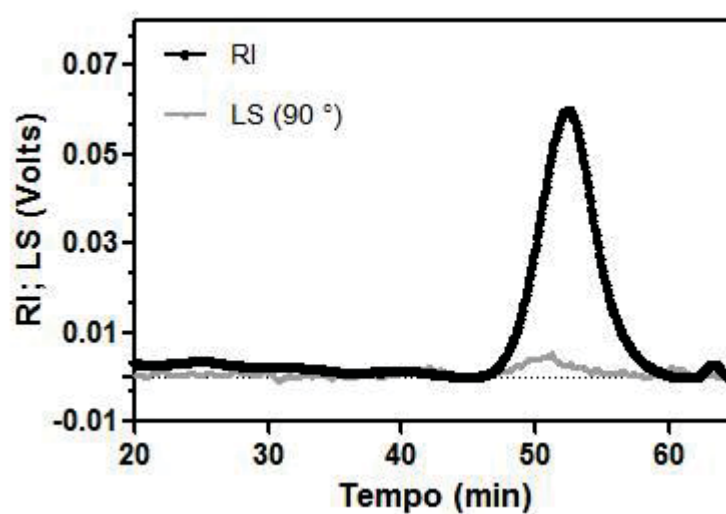
As frações polissacarídicas BG-KD1 e BG-KD2 foram analisadas em HPSEC-MALLS-RI (FIGURAS 115 e 116, respectivamente), e tiveram suas massas molares ponderais médias (M_w) estimada em $1,2 \times 10^4$ e $1,9 \times 10^4$ g.mol⁻¹, respectivamente. Este aumento da massa molar média estimada esta de acordo, pois a fração BG1-KD2 teve um maior percentual de carrabiose 4²-sulfato ligada que a fração BG-KD1.

FIGURA 115 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD1



RI: *refractive index*; LS: *Laser-light scattering*. FONTE: O autor(2018).

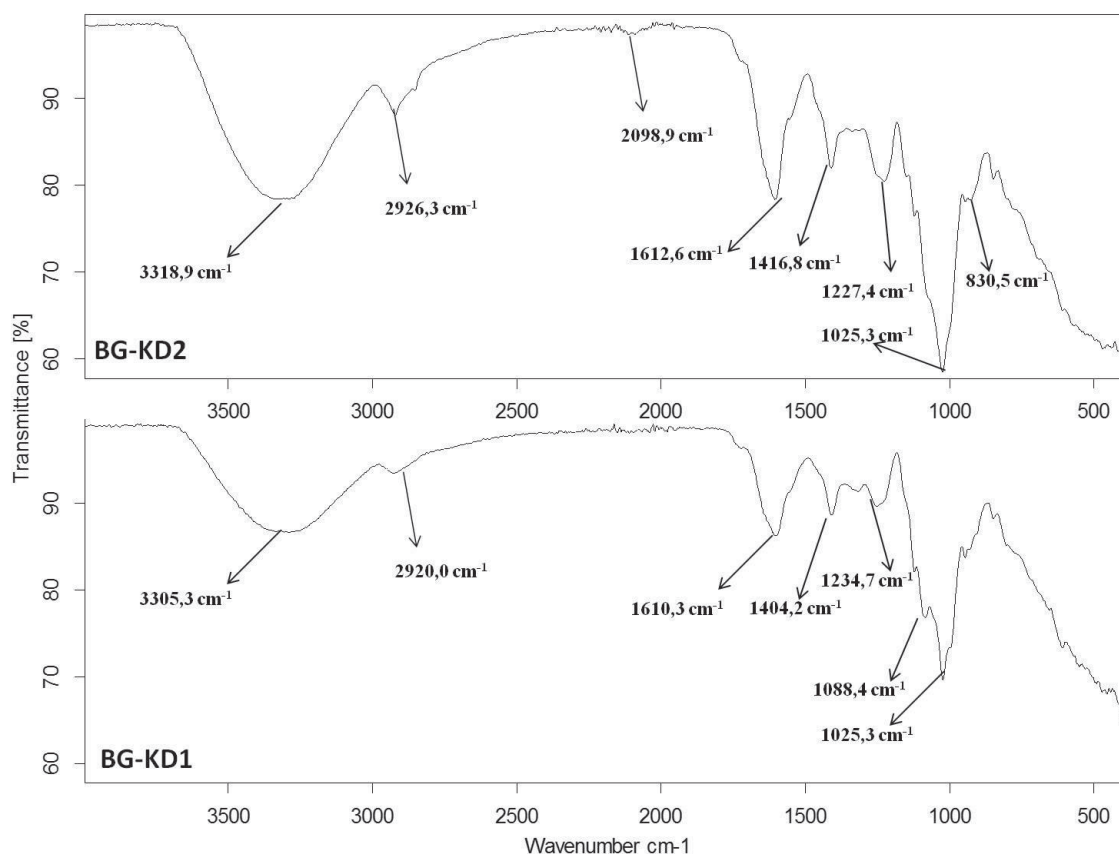
FIGURA 116 – HPSEC-MALLS-RI DA FRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD2



RI: *refractive index*; LS: *Laser-light scattering*. FONTE: O autor (2018).

Analisando os espectros de infravermelho das frações polissacarídicas híbridas BG-KD1 e BG-KD2 (FIGURA 117), destaca-se a banda presente nas duas frações em 1227,4-1234,7 cm^{-1} referentes ao estiramento vibracional assimétrico do grupo sulfato ($\text{O}=\text{S}=\text{O}$) (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003; SEKRAL; LEGRAND, 1993), comprovando a inserção do dissacarídeo carrabiose 4²-sulfato através da reação de aminação redutiva.

FIGURA 117 – ESPECTROS DE INFRA VERMELHO DOS OLIGOSSACARÍDEOS HÍBRIDOS BG-KD1 E BG-KD2



FONTE: O autor(2018).

Após a caracterização das reações de semissínteses, fica provado que as reações de aminação redutiva com o dissacarídeos carrabiose 4²-sulfato, foram realizados com sucesso, produzindo tanto o polissacarídeo híbrido do alginato-*Kappa*, como de blocos menores com diferentes estruturas e teores de grupo sulfato como os híbridos ácido manurônico-*kappa*, como com o ácido gulurônico-*kappa*.

Devido o amplo estudo de modificações químicas e funcionalizações do alginato na lietratura, para o desenvolvimento de novos biomateriais com potenciais aplicações biotecnológicas, a produção por semissínteses de polissacarídeos híbridos que apresentem tanto galactanas sulfatadas, como monossacarídeos que apresentem diferentes estereoquímicas nas estruturas (blocos BM e BG, ácido manurônico e ácido gulurônico, respectivamente), se mostram como interessantes materiais para aplicação biológica, devido ao conhecimento prévio que galactanas sulfatadas apresentam-se como potenciais compostos bioativos.

4.3 SEMISSÍNTESE DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO DE ULVANA-OLIGOSSACARÍDEO DERIVADO DA KAPPA-CARRAGENANA PERSULFATADA

4.3.1 Caracterização química e espectroscópica da Ulvana

COLODI (2017) determinou através da composição monossacarídica (CLG-EM), carboxirredução com borohidreto de sódio (NaBH_4 e NaBD_4) e permetilação, tanto do polissacarídeo nativo como do dessulfatado, que a cadeia principal da ulvana é constituída por unidades de rammnose, xilose, ácido glucurônico e ácido idurônico. Adicionalmente, os derivados da α -L-ramnose 4-ligadas totalizam aproximadamente 50 mol %, do polissacarídeo nativo, da mesma forma que o somatório dos derivados 4-ligados de β -D-xilose, β -D-ácido glucurônico e α -L-idurônico. Entretanto, considerando que o somatório das díades A3S e B3S (38,3 + 17,5) resulta em 56,8 mol % e que 50% deste valor é referente aos ácidos urônico (glucurônico e idurônico), a ulvana F apresenta 28,4 mol % de ácidos urônico. Desta forma COLODI (2017) determinou que estas unidades monossacarídicas estão distribuídas por díades, como proposto por LAHAYE (1998), nas proporções apresentadas na TABELA 33.

TABELA 33 – PROPORÇÕES DAS DÍADES PRESENTES NA ULVANA DE *U. fasciata*

Díade ^a	Monossacarídeos constituintes	Proporção ^b (%)
A _{3s}	[\rightarrow 4)- α -L-Rhap 3-sulfato-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcAp-(1 \rightarrow)]	39,3
B _{3s}	[\rightarrow 4)- α -L-Rhap 3-sulfato-(1 \rightarrow 4)- α -L-IdoAp-(1 \rightarrow)]	17,5
U _{3s}	[\rightarrow 4)- α -L-Rhap 3-sulfato-(1 \rightarrow 4)- β -D-xyIp-(1 \rightarrow)]	30,8
U _{2',3s}	[\rightarrow 4)- α -L-Rhap 3-sulfato-(1 \rightarrow 4)- β -D-xyIp 2-sulfato-(1 \rightarrow)]	12,0

^a A_{3s}: Ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A; B_{3s}: Ulvanobiurônico 3-sulfato tipo B; U_{3s}: Ulvanobiose 3-sulfato; U_{2',3s}: Ulvanobiose 2'3-dissulfato; ^b Proporção de díades (em mol %) obtidas por metilação, ajustada para 100 %. FONTE: COLODI, 2017.

A fração polissacarídica F, foi analisada através de RMN de ^{13}C , ^1H e HSQC, fornecendo espectros idênticos aos reportados por COLODI (2017). Os assinalamentos foram realizados conforme COLODI (2017), os quais foram baseados nos dados na literatura (LAHAYE et al., 1999; LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; LAHAYE; INIZAN; VIGOUREUX, 1998).

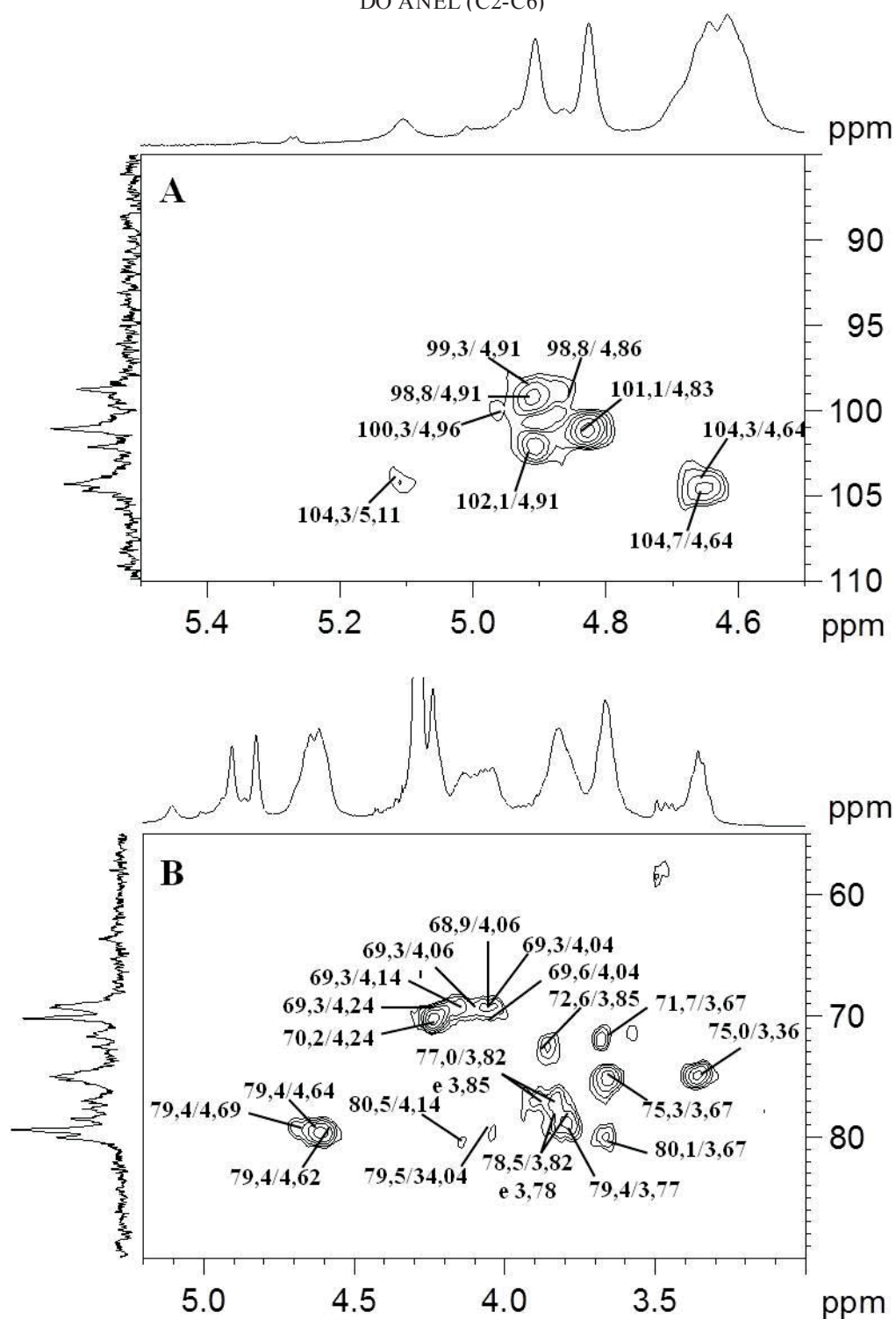
No espectro de RMN de HSQC (FIGURAS 118) da fração F, foram assinalados os carbonos e hidrogênios das quatro principais díades que compõem a ulvana. As correlações

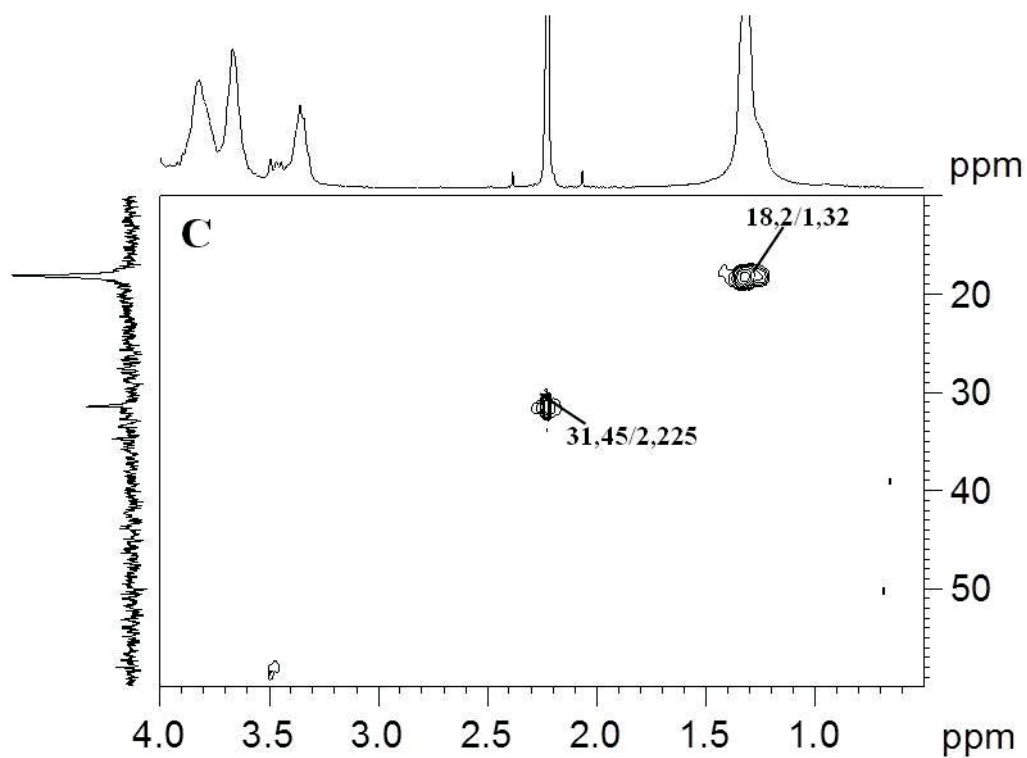
anoméricas (FIGURA 118 A) em 101,1/4,83 e 104,3/4,64 ppm foram atribuídas as unidades α -L-ramnose 3-sulfato e ácido β -D-glucurônico, respectivamente, constituindo a díade A_{3S}. Enquanto as correlações em 102,1/4,91 e 104,3/5,11 ppm foram atribuídas as unidades de α -L-ramnose 3-sulfato e ácido α -L-idurônico, respectivamente, constituindo a díade B_{3S} (COLODI, 2017; LAHAYE, 1998; LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997). Adicionalmente as correlações em 98,8/4,91 e 99,3/4,91 ppm foram atribuídas as unidades de α -L-ramnose 3-sulfato, ligadas a unidades de β -D-xilose (104,7/4,64 ppm) e β -D-xilose 2-sulfato (100,3/4,96 ppm), constituindo as díades U_{3S} e U_{2'3S}, respectivamente (COLODI, 2017; LAHAYE, 1998; LAHAYE; INIZAN; VIGOUREUX, 1998). Além destas díades descritas, foi possível identificar as correlações em 98,8/4,86 ppm atribuídas aos C/H das unidades de α -L-ramnose 3-sulfato presente entre unidades de β -D-xilose e β -D-xilose 2-sulfato (Xylp – **Rhap3S** – Xylp2S) (COLODI, 2017; LAHAYE, 1998).

O espectro de RMN de ¹³C (FIGURA 119) apresenta dois sinais na região de carboxila, 175,4 e 174,7 ppm atribuídos aos carbonos carbonílicos do β -D-GlcAp e α -L-IdoAp, respectivamente. Adicionalmente, também foram observados os sinais em 63,7 e 63,5 ppm atribuídos aos C5/H5 das unidades de β -D-xylp e β -D-xylp 2-sulfato, respectivamente.

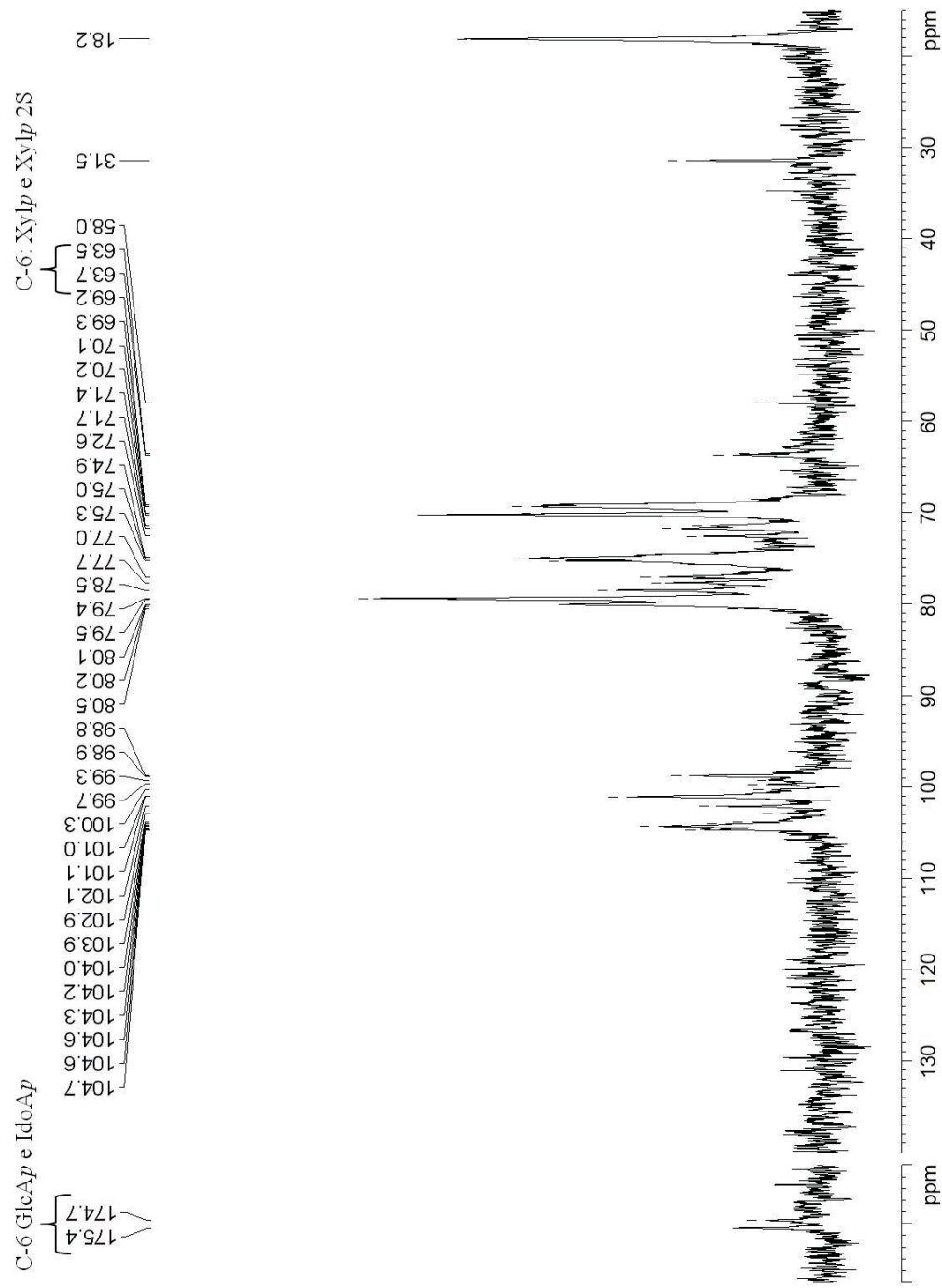
Na TABELA 34, estão apresentados os assinalamentos das díades (A_{3S}, B_{3S}, U_{3S} e U_{2'3S}) presentes na fração F.

FIGURA 118 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO F. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6)





Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,225). FONTE: O autor (2018).

FIGURA 119 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO F

Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (31,45). FONTE: O autor (2018).

TABELA 34 – ASSINALAMENTOS DOS $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DAS DÍADES CONSTITUINTES DA FRAÇÃO F

Díade	Monossacarídeo	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
A _{3S}	[\rightarrow 4)- α -L-Rhap 3S-(1 \rightarrow]	101, 1/4,83	70,2/4,24	79,4/4,62	79,4/3,77	69,3/4,14	18,2/1,32
	[\rightarrow 4)- β -D-GlcAp 2S-(1 \rightarrow]	104,3/4,64	75,0/3,36	75,3/3,67	80,1/3,67	77,0/3,82	175,4
B _{3S}	[\rightarrow 4)- α -L-Rhap 3S-(1 \rightarrow]	102, 1/4,91	70,2/4,24	79,4/4,69	79,4/3,77	69,6/4,04	18,2/1,32
	[\rightarrow 4)- α -L-IdoAp-(1 \rightarrow]	104,3/5,11	71,7/3,67	72,6/3,85	79,5/4,04	n.d.	174,7
U _{3S}	[\rightarrow 4)- α -L-Rhap 3S-(1 \rightarrow]	98,8/4,91	70,2/4,24	79,4/4,64	78,5/3,78	69,3/4,04	18,2/1,32
	[4)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow]	104,7/4,64	75,0/3,36	75,3/3,67	75,3/3,67	63,7/n.d.	-
U _{2,3S}	[\rightarrow 4)- α -L-Rhap 3S-(1 \rightarrow]	99,3/4,91	70,2/4,24	79,4/4,64	78,5/3,82	69,3/4,06	18,2/1,32
	[\rightarrow 4)- β -D-Xylp 2S-(1 \rightarrow]	100,3/4,96	80,5/4,14	72,6/3,85	75,3/3,67	63,5/n.d.	-
	[\rightarrow 4)- β -D-Xylp 2S-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap 3S-(1 \rightarrow 4)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow]	98,8/4,86	69,3/4,24	79,4/4,69	77,0/3,85	68,9/4,06	18,2/1,32

^a A_{3S}: Ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A; B_{3S}: Ulvanobiurônico 3-sulfato tipo B; U_{3S}: Ulvanobiose 3-sulfato U_{2,3S}: Ulvanobiose 2'3-dissulfato. Solvente D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,225). FONTE: O autor (2018).

A fração F, apresentou 24,0% de grupos sulfatos (TABELA 35), valor este próximo ao determinado por COLODI, 2017 para mesma fração F (21,4%).

TABELA 35 – ANÁLISE DE SULFATO NA FRAÇÃO F

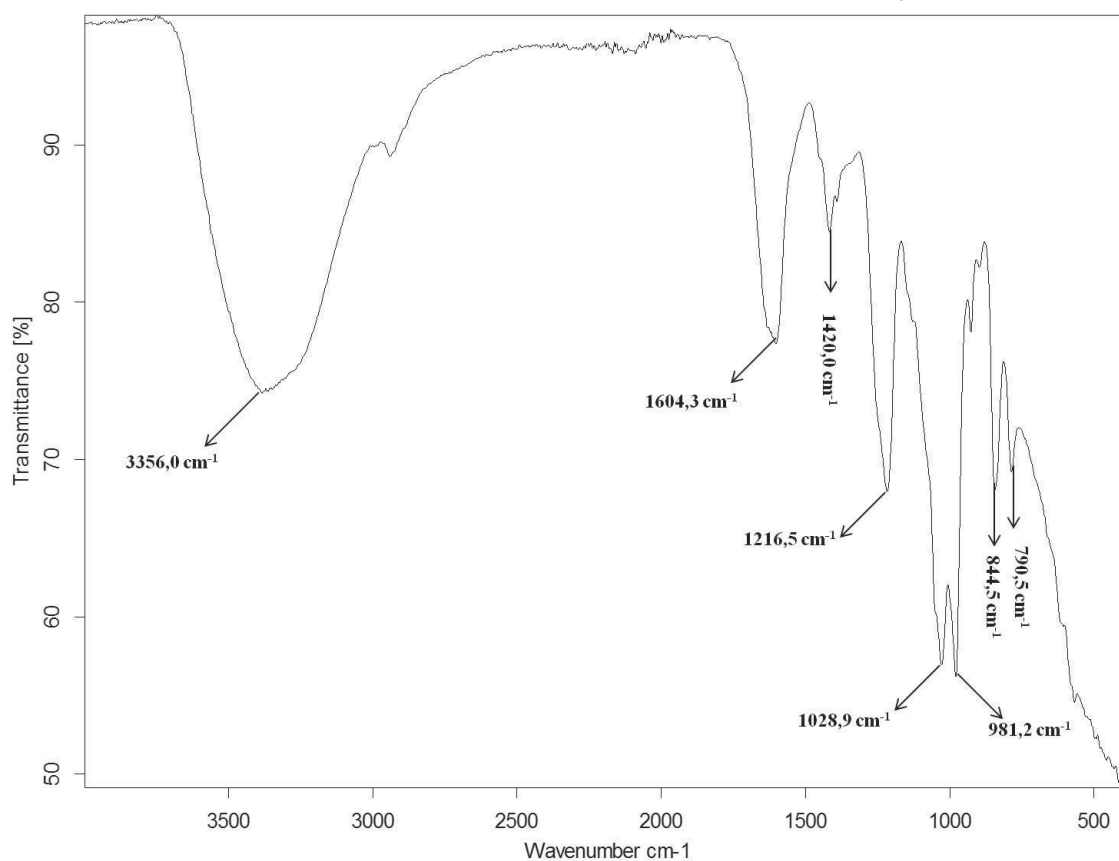
Fração	SO ₄ ^{-a} (%)	NaSO ₃ (%)	S (%)
K	22,4	24,0	8,0

^a determinações de acordo com os métodos de Dodgson (1961).

O espectro de infravermelho da fração F (FIGURA 120) apresentou uma intensa banda de transmitância em 1216,5 cm⁻¹ e outra mais fraca em 1420,0 cm⁻¹, as quais foram atribuídas ao estiramento assimétrico e ao alongamento simétrico dos grupos carboxilas, respectivamente. Entretanto a banda em 1216,5 cm⁻¹ também foi atribuída ao estiramento vibracional assimétrico dos grupos sulfato (O=S=O). Adicionalmente a banda em 844,5 cm⁻¹ corresponde ao estiramento vibracional característico de grupos sulfatos, presente nas unidades de α-L-ramnose e β-D-xilose (LAHAYE; ROBIC, 2007; ROBIC et al., 2009).

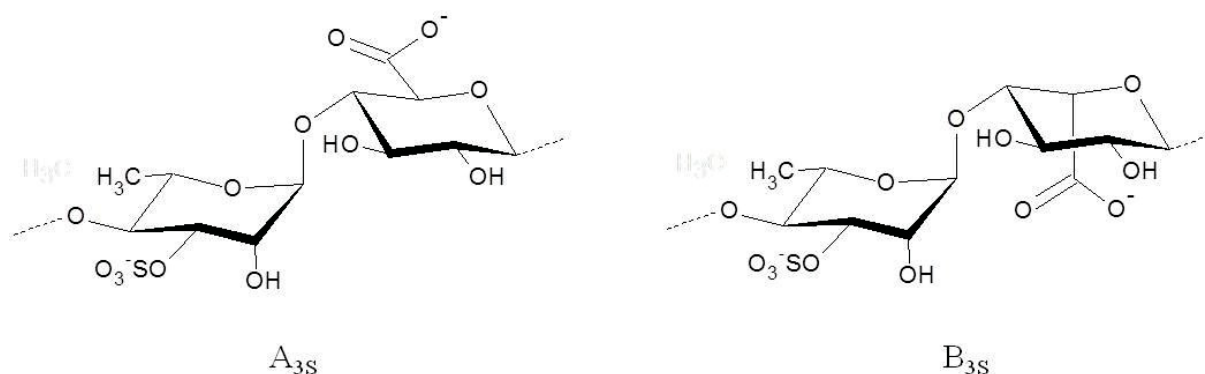
ROBIC e colaboradores (2009) relataram a presença da banda de absorbância em torno de 1055 cm⁻¹, sendo característica de ulvanas, provavelmente devido à presença dos monossacarídeos ramnose e ácido glucurônico. No presente trabalho esta banda foi observada em 1028,9 cm⁻¹.

FIGURA 120 – ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DA FRAÇÃO F



Wavenumber: número de onda; *Transmittance*: transmitância. FONTE: O autor (2018).

Devido à caracterização realizada por COLODI, 2017 e a presente caracterização química da fração F, permitiu identificar e quantificar a presença das diádes A_{3S} e B_{3S} (FIGURA 121), as quais apresentam 28,4% de ácidos urônicos (ácido β-D-glucurônico e ácido α-L-idurônico), passíveis de modificação química, bem como o alto grau de pureza desta fração. Desta forma, a fração F foi funcionalizada com a 1,3-propanodiamina, e utilizada para produção de polissacarídeos híbridos por semissíntese, com o oligossacarídeo KD-OS como descrito a seguir.

FIGURA 121 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS DÍADES A_{3S} E B_{3S}

FONTE: O autor (2018).

4.3.2 Otimização da reação de amidação dos grupos carboxilas da ulvana utilizando carbodiimida

Algumas reações de amidação da fração F, já foram realizadas e testadas por COLODI (2017), entretanto não tinham como objetivo promover a amidação total dos ácidos urônicos, tendo em vista que as carboxilas também constituem grupos interessantes para atividade biológica. Diferentemente no presente trabalho, as reações de amidação, foram conduzidas a fim de se promover o maior percentual de amidação, com a menor quantidade de subprodutos formados (*N*-aciluréia e *O*-acilisouréia).

Novas reações de amidação da ulvana (fração F) foram estabelecidas, baseadas nas reações realizadas por COLODI, 2017 e PARK e colaboradores, 2017. Desta forma, a fração F foi submetida a diferentes reações de amidação, nas quais foram variados os pHs reacionais (4,27 e 6,5), a razão molar da carbodiimida EDC:NHS (2:1 e 4:6,6), temperatura (30 e 50 °C) e tempo de reação (3 e 24 h). Sendo mantido fixo a concentração de polissacarídeo em solução (1% m/v), a concentração do tampão MES (0,2 mol.L⁻¹), e o número de mmols da 1,3-propanodiamina (Dap) (20 mmols).

As reações de amidação foram avaliadas quanto à formação de produto (amida) e subproduto (*N*-aciluréia e *O*-acilisouréia) com o auxílio da análise de RMN de ¹H. Além disto, para tal avaliação, foi considerado que a fração F é composta por 50% de α-L-ramnose 3-sulfato e 28,4% de ácidos urônicos (ácido β-D-glucurônico e ácido α-L-idurônico).

Para os cálculos estequiométricos das reações, foi considerado que 1 mol da ulvana (fração F), equivale ao somatório das duas díades que apresentam ácidos urônicos (carboxilas): Ulvanobiurônico 3-sulfate tipo A + Ulvanobiurônico 3-sulfate tipo B (826 g.mol⁻¹) nas formas sódicas.

Os valores referentes a 1 mol de cada reagente utilizado nestas reações de otimização estão apresentados na TABELA 36.

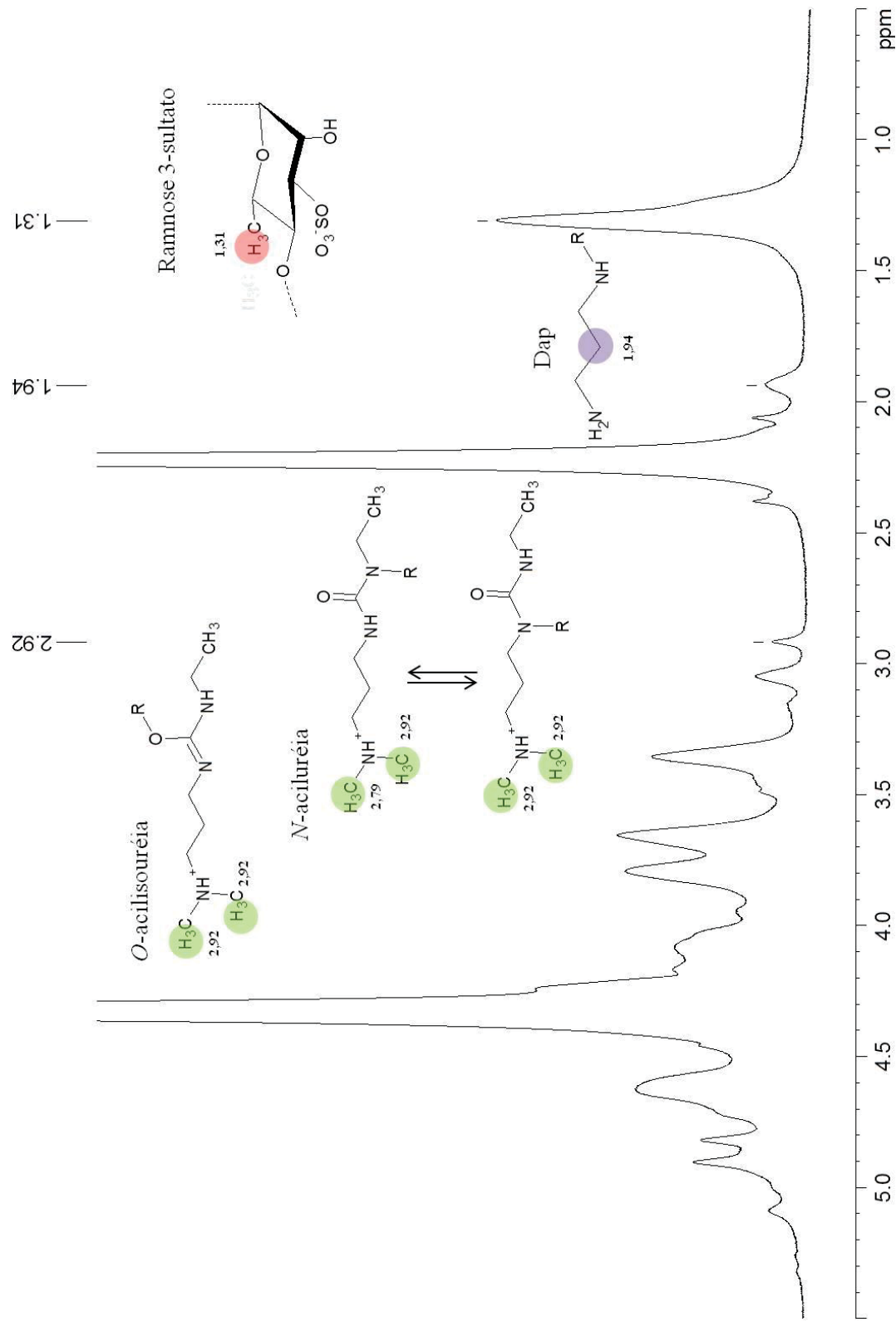
TABELA 36 – VALORES DE MASSA MOLECULAR DOS REAGENTES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE OTIMIZAÇÃO DE AMIDAÇÃO VIA CARBODIIMIDA DA ULVANA

Composto	g. mol ⁻¹
Fração F	826,0
EDC	191,7
NHS	115,1
DAP	74,12

FONTE: O autor (2018).

A FIGURA 122 mostra como exemplo o espectro de RMN de ¹H da reação de amidação da fração F, conduzida conforme a entrada F01 (TABELA 36). As integrações dos sinais no espectro de RMN de ¹H, foram utilizados para o cálculo de formação de produtos (amida) e subprodutos da amidação (*N*-aciluréia e *O*-acilisouréia). O sinal em 1,94 ppm é referente ao C2' da 1,3-propanodiamina no produto da reação (R-CONHCH₂CH₂CH₂NH₂). Já o sinal em 2,92 ppm, é atribuído aos 2 grupos metílicos da *N*-aciluréia e *O*-acilisouréia (R-NH⁺(CH₃)₂) (COLODI, 2017; INOUE; NAGASAWA, 1982). O sinal em 1,31 é referente ao C6/H6 das unidades de α-L-ramnose 3-sulfato. Este sinal foi selecionado para esta quantificação indireta de amidação, pois todas as díades presentes na fração F apresentam unidades de α-L-Rhap 3-sulfato, a qual não é passível de modificação química por amidação, além das posições C6/H6 não apresentarem deslocamento químico e sobreposição com outros sinais (no espectro de RMN de ¹H), sendo possível estimar o percentual de amidação do polissacarídeo.

FIGURA 122 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H INTEGRADO DOS PRODUTOS DE AMIDAÇÃO DA ULVANA (ENTRADA F01)



Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (2,225 ppm). R: unidades de α -L-IdoAp ou β -D-GlcAp e DAP: 1,3-propanodiamina. FONTE: O autor (2018).

A fim de se determinar a relação de produto (P):subproduto (SP) formado nas reações, foi realizada uma relação entre a área de integração do sinal 1,94 e 2,92 ppm, divididas pelo número de hidrogênios respectivo de cada sinal. Além disto, foi considerado para o cálculo que a área referente a DAP consiste em 1 unidade amidada, e que a área dos H metílicos da ramnose 3-sulfato correspondem a 50% do polissacarídeo.

Considerando:

- 1 CH_2 da DAP - $1,000/2 \text{ H} \rightarrow 0,500$
- 2 CH_3 da *N*-aciluréia e *O*-acilisouréia - $0,380/6\text{H} \rightarrow 0,063$
- 1 CH_3 da ramnose 3-sulfato da ulvana (F) - $10,120/3\text{H} \rightarrow 3,37$

A relação de produto:subprodutos (P:SP) é dado por:

$$\text{Subproduto} = \frac{0,063 \times 1 \text{ un. amidada}}{0,500} = 0,1 \text{ un. de subprodutos}$$

O número de unidades monossacarídicas amidadas no polissacarídeo a cada 10 unidades monossacarídicas de Rha-3S é dado por:

$$\text{Un. amidadas} = \frac{0,50 \times 10 \text{ un. monossacarídica de Rha} - 3\text{S}}{3,37} = 1,5 \text{ un.}$$

Considerando que 10 unidades monossacarídicas de Rha 3S são 50% do polissacarídeo, 100% seriam 20 unidades monossacarídicas. Desta forma o percentual de amidação no polissacarídeo total é dado por:

$$\text{Amidação total da ulvana \%} = \frac{1,5 \text{ un. amidadas} \times 100 \%}{20 \text{ un. monossacarídicas}} = 7,4\%$$

Admitindo que o polissacarídeo apresenta 28,4% de ácidos urônicos, o percentual total de ácidos urônicos amidados é dado por:

$$\text{Urônicos amidados \%} = \frac{7,4 \% \text{ do poli} \times 100 \%}{28,4 \% \text{ de urônicos}} = 26,1\%$$

O número de unidades monossacarídicas modificadas por subprodutos (SP) no polissacarídeo a cada 10 unidades monossacarídicas de Rha-3S é dado por:

$$\text{Un. subprodutos} = \frac{0,063 \times 10 \text{ un. monossacarídica de Rha} - 3\text{S}}{3,14} = 0,2 \text{ un.}$$

Considerando que 10 unidades monossacarídicas de Rha 3S são 50% do polissacarídeo, 100% seriam 20 unidades monossacarídicas. Desta forma o percentual de subproduto no polissacarídeo total é dado por:

$$\text{Subproduto total \%} = \frac{0,2 \text{ un. subprodutos} \times 100\%}{20 \text{ un. monossacarídicas}} = 0,9\%$$

Desta forma o polissacarídeo apresenta 0,9% de subprodutos. Admitindo que o polissacarídeo apresente 28,4% de ácidos urônicos:

$$\text{Urônicos subprodutos \%} = \frac{0,9\% \text{ do poli} \times 100\%}{28,4\% \text{ de urônicos}} = 3,3\%$$

O percentual total de modificação no polissacarídeo:

$$\text{Modificação total \%} = (7,4\% + 0,9\%) = 8,3\%$$

E o percentual de modificação dos urônicos totais é:

$$\text{Modificação total \%} = (26,1\% + 3,3\%) = 29,4\%$$

Desta maneira, na reação de amidação (entrada F01), a cada 1 unidade amidada com a DAP estão presentes 0,2 unidades de subproduto, na forma de *N*-aciluréia ou *O*-acilisouréia. Adicionalmente 7,4% do polissacarídeo estão amidadas com a DAP e 0,9% estão modificados como *N*-aciluréia ou *O*-acilisouréia, resultando em 8,3% de modificação total do polissacarídeo. Considerando que 7,4% do polissacarídeo total foram amidados e que a ulvana possui 28,4% de carboxilas passíveis de modificação química, conclui-se que 26,1% das carboxilas foram amidadas com a DAP.

Na TABELA 37 estão apresentadas as condições reacionais utilizadas no processo de otimização da amidação via carbodiimida da ulvana (entrada F01 até F06). Adicionalmente, estão apresentados os percentuais de amidação, subprodutos e de modificação total do polissacarídeo, tanto em relação ao polissacarídeo (100%), como também em relação ao percentual de urônicos (28,4%). Além disto, estão apresentadas as relações entre produto e subprodutos (P:SP) formado em cada reação (cálculos já demonstrados).

TABELA 37 – REAÇÕES DE OTIMIZAÇÃO DA AMIDAÇÃO VIA CARBODIIMIDA DA ULVANA

Ent.	F (mmol)	DAP (mmol)	EDC (mmol)	NHS (mmol)	EDC:NHS	pH	Temp. (°C)	Rend (%)	P:SP ^a	Amidação total ^b (%)	Amidação urônicos ^c (%)	Subproduto Total ^d (%)	Subproduto Urônicos ^e (%)	Modificação total ^f (modificação urônicos ^g (%)
F01	0,12	2,4	0,48	0,79	4:6,6	4,27	30	87,4	1:0,2	7,4	26,1	0,9	3,3	8,3 (29,4)
F02	0,12	2,4	0,48	0,79	4:6,6	4,27	30	60,0	1:0,2	5,3	18,7	0,8	2,7	6,1 (21,4)
F03	0,12	2,4	0,24	0,12	2:1	4,27	30	76,8	1:0,8	12,6	44,5	8,3	29,3	20,9 (73,8)
F04	0,12	2,4	0,24	0,12	2:1	6,5	30	73,4	1:0,7	6,6	23,2	4,4	15,6	11 (38,8)
F05	0,12	2,4	0,24	0,12	2:1	4,27	24	82,5	1:0,7	9,7	34,1	7,1	25,2	16,8 (59,3)
F06	0,12	2,4	0,24	0,12	2:1	6,5	24	80,0	1:0,7	8,2	28,9	6,8	24,1	15 (53)

^a relação entre amida e subprodutos; ^b percentual de amidação total do polissacarídeo; ^c Percentual total de amidação com relação ao total de ácidos urônicos; ^d percentual de subprodutos (*O*-acilisouréia e *N*-aciluréia) total do polissacarídeo; ^e Percentual total de subprodutos (*O*-acilisouréia e *N*-aciluréia) com relação ao total de ácidos urônicos; ^f percentual total de modificação do polissacarídeo; ^g percentual total de modificação em relação aos ácidos urônicos. FONTE: O autor (2018).

Na entrada F01, a reação foi realizada em tampão MES, no pH 4,27, próximo a faixa de pH ótima para a primeira etapa da reação (3,5 – 4,5), a ativação da carboxila (NAKAJIMA; IKADA, 1995). A reação foi conduzida em presença da DAP, 4 mmols de EDC e 6,6 mmols de NHS, a 30 °C durante 3 h. Foram observados a formação tanto de amida (26,1% em relação aos ácidos urônicos), como também de subprodutos (3,3% em relação aos ácidos urônicos).

Em seguida foi realizada a reação de acordo com a entrada F02, a qual apresentava as mesmas condições reacionais que a entrada F01, com excessão do tempo de reação, que foi alterado de 3 horas para 24 horas, na tentativa de se aumentar o percentual de amidação. Como resultado desta reação (entrada F02), foram obtidos menores percentuais de amidação que a entrada F01: 18,7% de amidação e 2,7% de subprodutos, ambos em relação aos ácidos urônicos, indicando que reação conduzida com excesso de NHS (6,6 mols de excesso), apresenta melhores resultados de amidação da ulvana, quando realizadas em tempos mais curtos de reação.

Baseando-se nas condições de otimização realizadas para amidação do alginato de sódio, no presente trabalho, o qual apresentava melhores rendimentos quando utilizado excesso de EDC em relação ao NHS (na entrada A07), foram realizadas reações de amidação da ulvana com esta mesma relação de EDC:NHS (2:1). Além disto, a fim de se comparar os percentuais de amidação em um pH que seja mais favorável ao ataque nucleofílico da diamina (pH mais básico), em presença do intermediário derivado NHS, que permite melhores rendimentos de acoplamento de aminas em pH neutro ou levemente básico (pH 7,0 – 8,5) (BULPITT, AESCHLIMANN; 1999), foram realizadas reações em pH 6,5 em conjunto à reações em pH 4,27, para fins comparativos.

As entradas F03 e F04, as quais foram conduzidas fazendo uso da proporção 2:1 de EDC:NHS, a 30 °C, durante 24 horas, utilizando diferentes pHs: 4,27 para entrada F03 e 6,5 para entrada F04. Desta forma, foi observado um maior percentual de amidação na entrada F03 (44,5% em relação aos ácidos urônicos), a qual apresenta um pH reacional mais ácido (4,27) que na entrada F04, (que apresentou 23,4% de amidação em relação aos ácidos urônicos), comprovando que o pH mais ácido é realmente mais favorável a reação de amidação, como reportado por NAKAJIMA e IKADA (1995). Entretanto, apesar do aumento do percentual de amida, também foram observados o aumento na formação de subprodutos (29,3 e 15,6% de subprodutos em relação aos ácidos urônicos para as entradas F03 e F04, respectivamente).

Para amidação dos ácidos urônicos da ulvana (ácido α -L-idurônico e ácido β -D-glucurônico), o pH ácido (4,27) favorece a primeira etapa da reação, a ativação da carboxila por meio da carbodiimida EDC, formando o intermediário *O*-acil (NAKAJIMA; IKADA, 1995). Este resultado é diferente do observado para a amidação do alginato de sódio, o qual apresenta melhores percentuais de amidação em pHs mais altos (6,5).

Além da variação da relação EDC:NHS e o pH, também foi variado a temperatura reacional, que foi aumentada de 30 °C para 50 °C.

Inicialmente, foi realizada a entrada F05, a qual foi conduzida com a relação de 2:1 de EDC:NHS, por 24 horas, a 50 °C em pH 4,27. Esta entrada apresentou um percentual de 34,1% de amidação e 25,2% de subprodutos, em relação aos ácidos urônicos. Indicando que o aumento da temperatura da reação em pH 4,27, desfavorece a formação tanto de amida, como de subprodutos, quando comparada a entrada F03, que apresenta as mesmas condições reacionais, exceto pela temperatura menor (30 °C).

Adicionalmente, foi realizada a entrada F06, conduzida com a relação de 2:1 de EDC:NHS, por 24 horas, a 50 °C em pH 6,5, a qual apresentou maiores percentuais de amidação (28,9% em relação aos ácidos urônicos) que a entrada F04 (23,2% em relação aos ácidos urônicos), a qual apresenta as mesmas condições reacionais, exceto pela temperatura menor (30 °C). Entretanto apesar do aumento do percentual de amida, também foram observados o aumento na formação de subprodutos (24,1% em relação aos ácidos urônicos), quando comparado a entrada F04 (15,6% em relação aos ácidos urônicos).

Assim destaca-se que a entrada F01 apresentou o maior percentual de amidação do polissacarídeo (7,4% do polissacarídeo amidado, representando 26,1% dos ácidos urônicos), com o menor percentual de subprodutos formados (0,9% do polissacarídeo, representando 3,3% dos ácidos urônicos), sendo selecionada como a condição reacional para a funcionalização da ulvana via amidação, a qual foi utilizada para produção por semissíntese de polissacarídeos híbridos constituídos por ulvana e o produto de hidrólise ácida parcial obtido da *kappa*-carragenana persulfatada.

4.3.3 Semissíntese de F1D

Uma reação em maior escala de amidação da ulvana foi realizada conforme a condição F01, com 1,3-propanodiamina (DAP), resultando na fração F1D (85,2% de rendimento).

A fração amidada F1D foi analisada através de RMN de ^1H , ^{13}C de HSQC, apresentando novos sinais, com relação aos espectros de RMN da fração F.

No espectro de HSQC (FIGURA 123) foram assinaladas as novas correlações em 37,5/3,36, 27,7/1,94 e 38,5/3,05 ppm, as quais foram atribuídas aos C/H da 1,3-propanodiamina ligada. A correlação em 37,3/3,36 ppm corresponde ao C1'/H1' (CONHCH₂CH₂CH₂NH₂) do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida, e as correlações em 38,5/3,05 e 27,7/1,94 ppm foram atribuídas ao C3'/H3' (CONHCH₂CH₂CH₂NH₂) e C2'/H2' (CONHCH₂CH₂CH₂NH₂) do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida, respectivamente (CHHATBAR et al., 2011; COLODI, 2017).

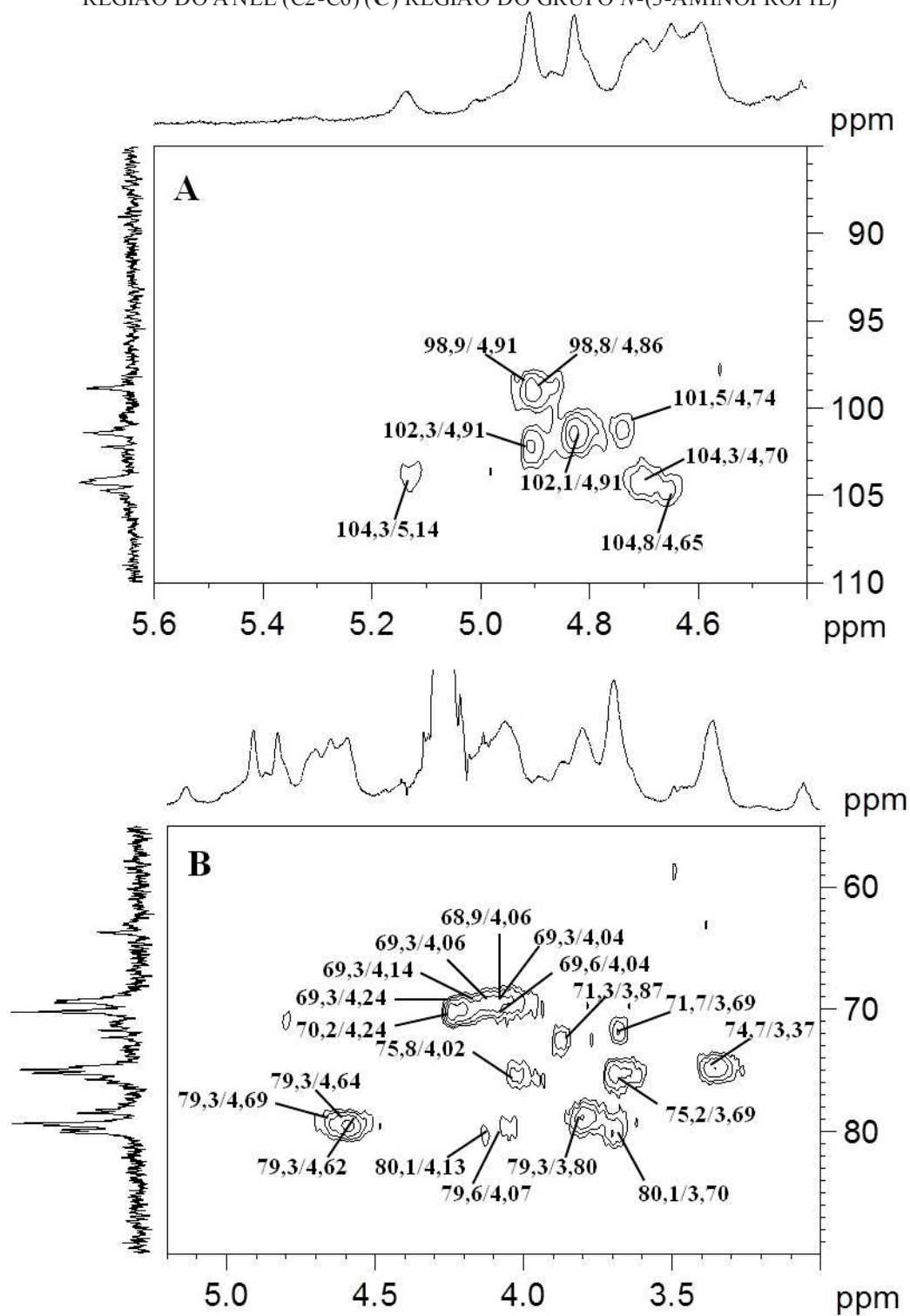
Além das correlações referentes ao grupo *N*-(3-aminopropil)-amida foram observadas outras correlações atribuídas ao intermediário *O*-acilisouréia e ao subproduto *N*-aciluréia. O deslocamento químico em 44,2/2,94 ppm foi atribuído aos grupos metílicos (NH⁺(CH₃)₂) tanto do intermediário como do subproduto (COLODI, 2017; INOUE; NAGASAWA, 1982). Adicionalmente, na região do anel (FIGURA 123 B), foi observado o desaparecimento da correlação em 77,0/3,82 ppm, atribuída aos C5/H5 das unidades de β-D-GlcAp presentes na fração F (COLODI, 2017; LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997). No entanto, uma nova correlação em 75,8/4,02 ppm foi observada e atribuída ao C5/H5 das unidades de β-D-GlcAp amidados (efeito beta -1,2/+ 0,2 ppm) (COLODI, 2017).

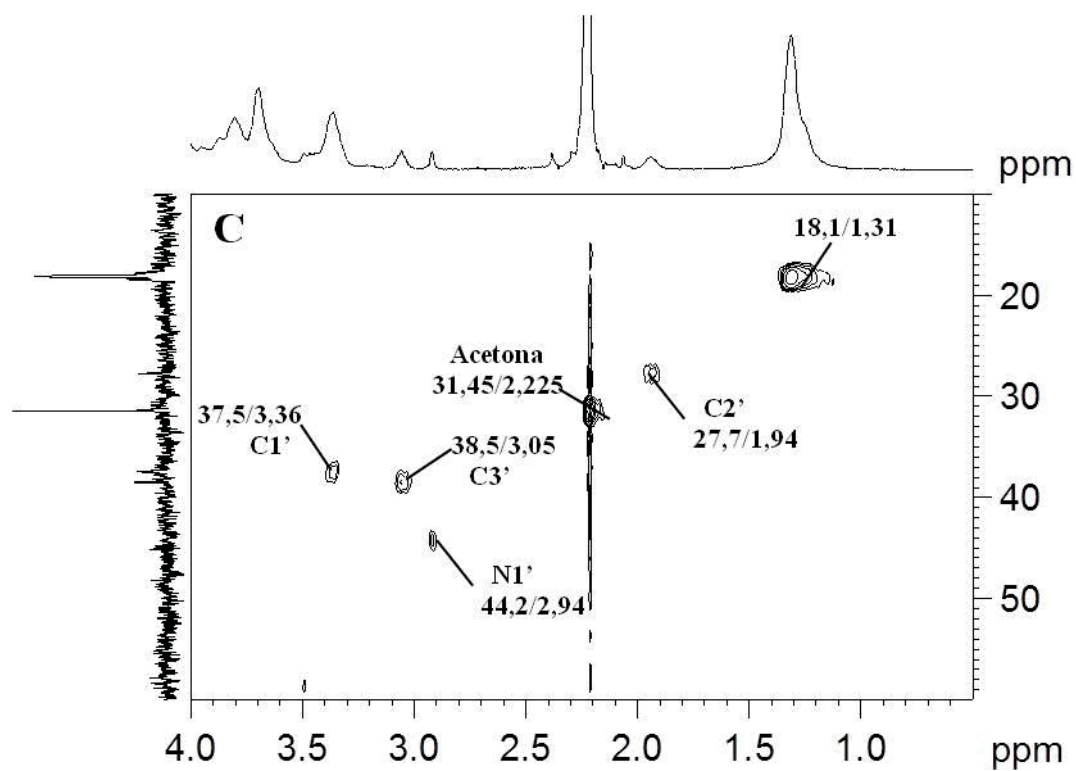
Na região anomérica do espectro de RMN de HSQC (FIGURA 123 A), também foram observados novas correlações. O sinal em 101,5/4,74 ppm, foi atribuído ao C1/H1 das unidades de α-L-Rhap 3-sulfato ligadas às unidades de β-D-GlcAp amidado com a DAP. (COLODI, 2017). Além disto, um deslocamento químico nos C1/H1 das unidades de β-D-GlcAp, foram observados em 104,3/4,70 ppm e atribuído a estas unidades amidadas (COLODI, 2017). Entretanto, apesar de terem sido observados sinais referentes a amida, e deslocamentos químicos na díade ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A, não foram identificados sinais que indiquem a modificação química nas unidades de α-L-IdoAp (díade + ulvanobiurônico 3-sulfato tipo B), sendo uma evidência que a amidação ocorreu principalmente nas carboxilas das unidades de β-D-GlcAp.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por COLODI (2017), que realizou a amidação via EDC/NHS com a DAP, desta mesma fração F.

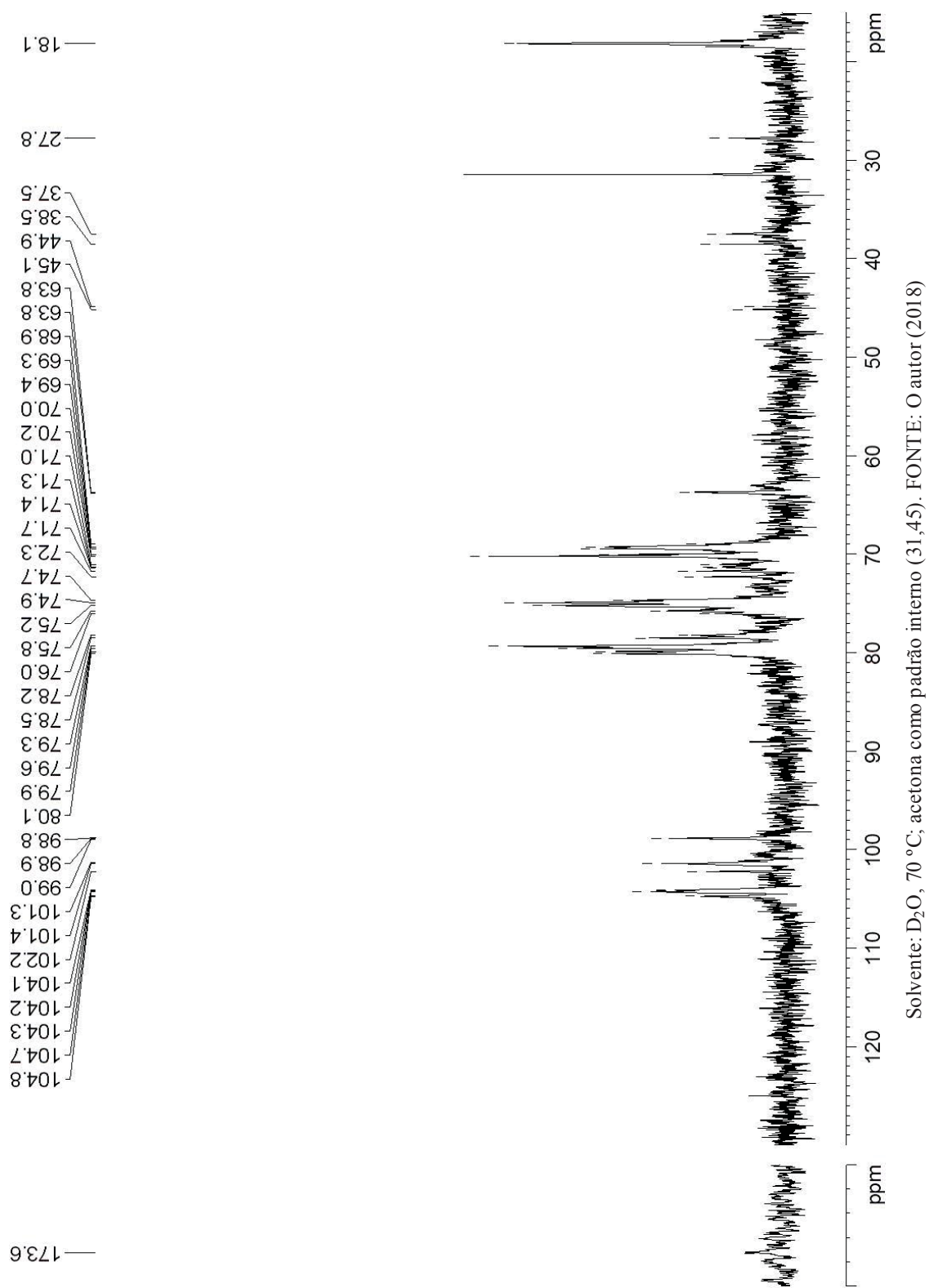
Através do espectro de RMN de ^{13}C da fração F1D (FIGURA 124) foi identificado um novo sinal em 173,6 ppm, o qual foi atribuído a carbonila do ácido β-D-glucurônico, amidada com a DAP.

FIGURA 123 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO FID. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6) (C) REGIÃO DO GRUPO *N*-(3-AMINOPROPIL)





Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,225). FONTE: O autor (2018).

FIGURA 124 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO FID

Através do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 125), foi estimado o teor de produto e subproduto na fração F1D. Foi determinado através do cálculo demonstrado no item 1.4, que 8% do polissacarídeo foi modificado, representando 28,2% das ácidos urônicos, estão na forma de *N*-(3-aminopropil)-amida e apenas 1,5% do polissacarídeo (5,3% dos ácidos urônicos) estão na forma de *O*-acilisouréia, e *N*-aciliuréia. Desde modo, a cada 1 unidade de *N*-(3-aminopropil)-amida formada, estão presentes 0,2 unidades de subprodutos.

Além disto, também foram realizadas as análises elementares de N e C das ulvanas nativa (fração F) e amidada (Fração F1D) com a 1,3-propanodiamina, como demonstrado na TABELA 38.

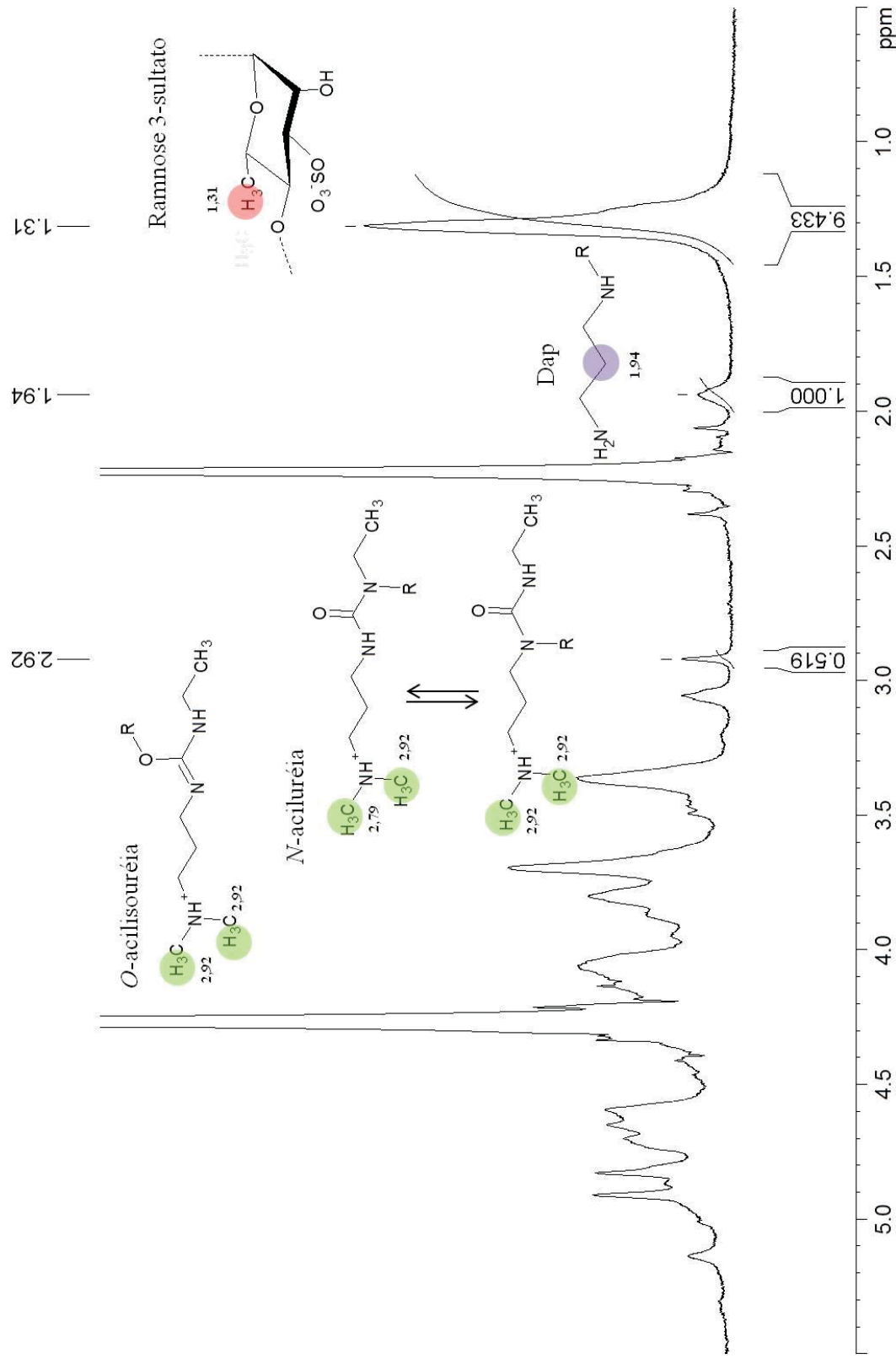
TABELA 38 – ANÁLISE ELEMENTAR DA ULVANA E SEU DERIVADO AMIDADO

Fração	N (%)	C (%)
F	0,64	29,65
F1D	1,35	31,65

Nº e C % corresponde aos percentuais de nitrogênio e carbono. FONTE: O autor (2018).

O aumento do percentual de nitrogênio da fração F1D confirma os dados de RMN de ^1H referente a amidagem da fração F.

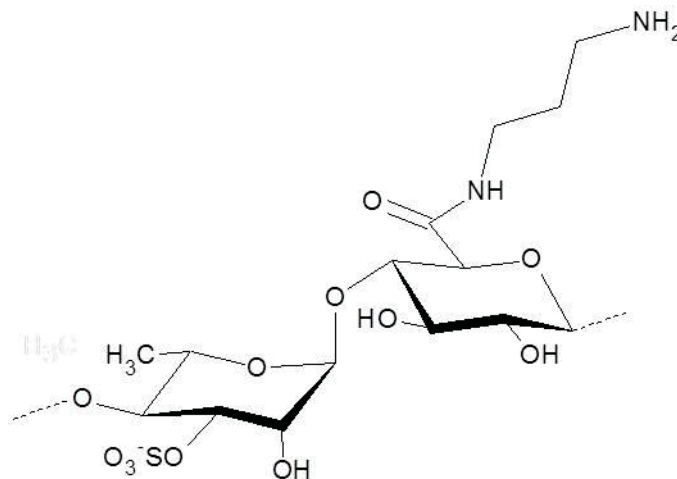
FIGURA 125 – INTEGRAÇÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO FID



Solvente: D_2O , 70°C ; acetona como padrão interno (2,225 ppm). R: unidades de $\beta\text{-D-GlcAp}$; DAP: 1,3-propanodiamina. FONTE: O autor (2018)..

A FIGURA 126 ilustra uma estrutura hipotética da díade Ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A, amidada com a 1,3-propanodiamina.

FIGURA 126 – ESTRUTURA HIPOTÉTICA DA DÍADE ULVANOBIURÔNICO 3-SULFATO TIPO A AMIDADA COM A DAP



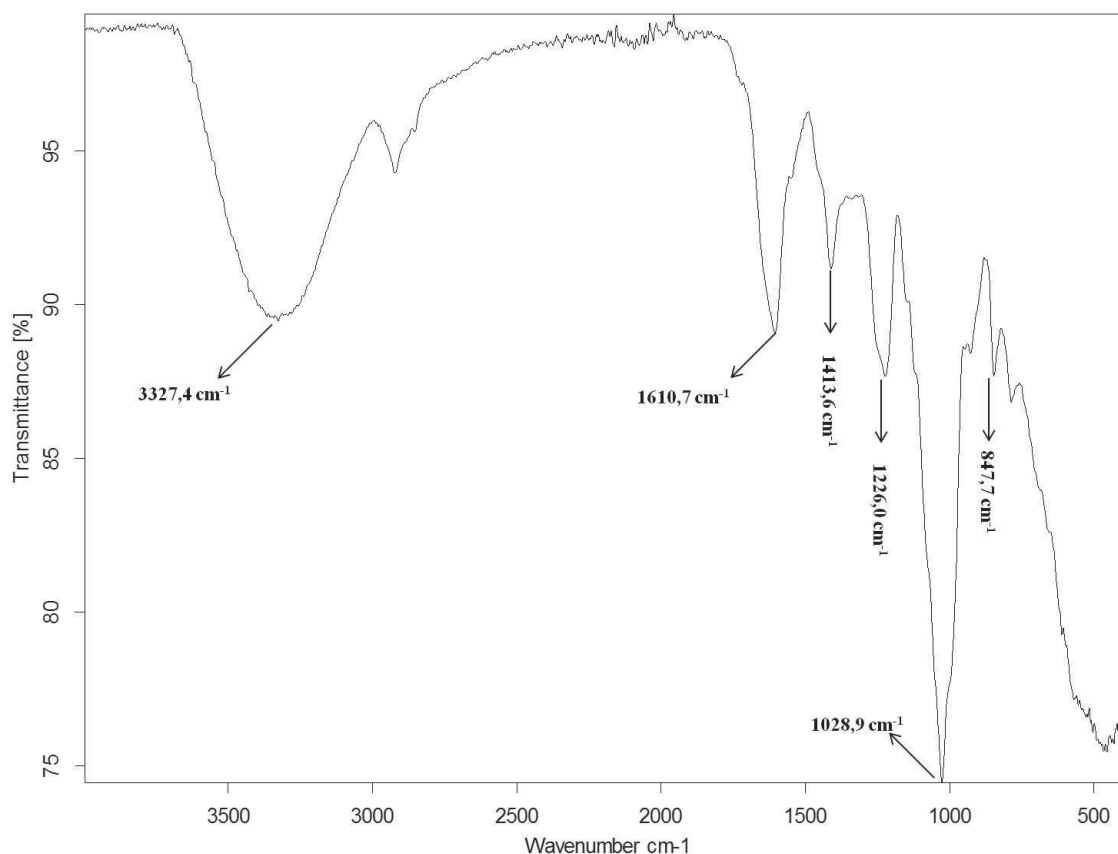
FONTE: O autor (2018).

Apesar de não terem sido realizadas análises quanto a viscosidade, após a liofilização e a resolubilização a quente da fração F1D, ela apresentou visivelmente um caráter mais viscoso, que a sua fração nativa (F). Este aumento na viscosidade e formação de hidrogéis mais fortes após reações de amidação são reportados na literatura para diferentes polissacarídeos como o alginato de sódio (CHEJARA et al., 2013; CHHATBAR et al., 2012) e o ácido hialurônico (PARK et al., 2017; POUYANI; PRESTWICH, 1994),

A FIGURA 127 apresenta o espectro de infravermelho da fração F1D. Comparando o espectro desta fração amidada com sua fração de origem (F), foi observado um discreto alargamento na banda de absorbância entre $1610,7 - 1652,0 \text{ cm}^{-1}$, a qual é característica da função amida (SILVERSTEIN, BASSLER E MORRILL, 1991).

Adicionalmente a banda de transmitância relatada como característica da presença dos monossacarídeos ramnose e ácido glucurônico em ulvanas (ROBIC et al., 2009), foi observada como uma forte e única banda em $1028,9 \text{ cm}^{-1}$, o que fez desaparecer a banda em $981,2 \text{ cm}^{-1}$.

FIGURA 127 – ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DA FRAÇÃO F1D



Wavenumber: número de onda; *Transmittance*: transmitância. FONTE: O autor (2018).

Em resumo foi possível produzir e caracterizar a ulvana amidada com a 1,3-propanodiamina, a qual apresenta 8 mol % de amidação. Este material pode ser utilizado para funcionalização com compostos, produzindo biomateriais com inúmeras aplicações e características. No presente trabalho este material (F1D), foi utilizado para produção do polissacarídeo híbrido inédito F1KDOS, através da reação de aminação redutiva com os oligossacarídeos KD-OS, produzidos anteriormente a partir da *kappa*-carragenana persulfatada.

4.3.4 Smissíntese de F1KDOS

Os oligossacarídicos KD-OS, apresentam extremidades aldeídicas, e a fração amidada F1D, possuem aminas primárias livres, oriunda do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida, sendo capaz de realizar o ataque nucleofílico à carbonila dos oligossacarídeos KD-OS, produzindo o íon imínio, que em seguida será reduzido pelo agente redutor.

Para os cálculos estequiométricos da reação de aminação redutiva entre a fração amidada (F1D) e a mistura oligossacarídica (KD-OS), foram considerados que 1 mol da fração F1D e KD-OS correspondem a 993 g.mol^{-1} (somatório da massa molecular das duas díades A_{3S} e B_{3S} amidadas com a DAP, nas formas sódicas) e $730,5 \text{ g.mol}^{-1}$ (referente a díade $G2S4S6S\text{-}DA2S$, na forma sódica), respectivamente.

Além disto, foram utilizados para cada 1 mol da fração amidada, 10 mols dos oligossacarídeos redutores, proporcionando um excesso de unidades aldeídicas passíveis do ataque nucleofílico da amina primária presente na fração F1D. Este excesso de aldeído foi utilizado a fim de deslocar o equilíbrio da reação para formação iminas.

O rendimento de recuperação da reação foi de 167,5% e como a massa recuperada foi maior que a massa inicial, sendo possível sugerir que moléculas presentes na fração KD-OS foram ligadas covalentemente a fração F1D. Destaca-se que, os oligossacarídeos presentes na fração KD-OS são moléculas pequenas e após a diálise elas seriam eliminadas pelos poros da membrana de diálise, permanecendo retido somente moléculas que apresentem uma massa molecular maior que MWCO 6-8 KDa.

A fração F1KD-OS, foi analisada por RMN de ^1H , ^{13}C , e HSQC. No espectro de RMN de HSQC (FIGURA 128 C) apresentou quatro correlações já assinaladas anteriormente na fração F1D, 37,5/3,36, 27,7/1,94 e 38,5/3,05 ppm referentes a $C1'$, $C2'$ e $C3'$ do grupo *N*-(3-aminopropil)-amida. Também foram observadas duas novas correlações de baixa intensidade, em 46,7/3,14 e 27,5/1,96 ppm, atribuídas aos C/H da extremidade da DAP ligada covalentemente a fração KDOS. O sinal de $C3'$ em 38,5/3,05 ppm, desloca-se para 46,7/3,14 ppm após a reação de aminação redutiva, enquanto $C2'$ vai de 27,7/1,94 ppm para 27,5/1,96 ppm.

Através dos espectros de HSQC (FIGURA 128 A) e RMN de ^{13}C (FIGURA 129 e 130) foi observado o sinal em 92,7/5,31 ppm, o qual foi atribuído ao $C1/H1$ das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopirranose 2-sulfato. Adicionalmente, o sinal em 103,7 ppm (FIGURA 129 B) presente na fração F1KD-OS, e ausente na fração F1D (FIGURA 123 A), foi atribuído a unidades de β -D-galactopirranose 4,6-disulfato (DE ARAÚJO et al., 2013; THÀNH et al., 2001).

A presença das unidades β -D-galactopirranose, foi confirmado pelos sinais observados tanto no espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 130 B), como pelo espectro de RMN de HSQC (FIGURA 128 B). O espectro de RMN de ^{13}C apresentou novos sinais na faixa de 68,8 – 67,7 ppm, quando comparado a fração F1D. Além disto, foi observada no espectro de RMN de HSQC (FIGURA 129 B) uma correlação centrada em aproximadamente 68,4/4,22

ppm. Desta forma estes sinais foram atribuídos aos C6/H6 das unidades de β -D-galactopiranosose 6-sulfato (DE ARAÚJO et al., 2013; THÀNH et al., 2001). Adicionalmente, também foram identificados os C6/H6 (62,2/3,81 ppm) das unidades de β -D-galactopiranosose não substituídas no carbono-6. (VAN DE VELDE et al., 2002). Desta forma, a identificação dos sinais referentes às unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato (interna) e β -D-galactopiranosose e a presença da correlação em 46,7/3,14 ppm indicam que, a reação de aminação redutiva entre a fração FD1 e KDOS ocorreu. Entretanto, a baixa intensidade do sinal, bem como a não observação dos outros sinais do oligossacarídeo, indicam que a reação ocorreu em baixos percentuais.

Foram realizadas determinações de nitrogênio, carbono, sulfato de sódio e enxofre tanto da fração F1KD-OS, como nas suas precursoras (F, F1D e KS-O) (TABELA 47).

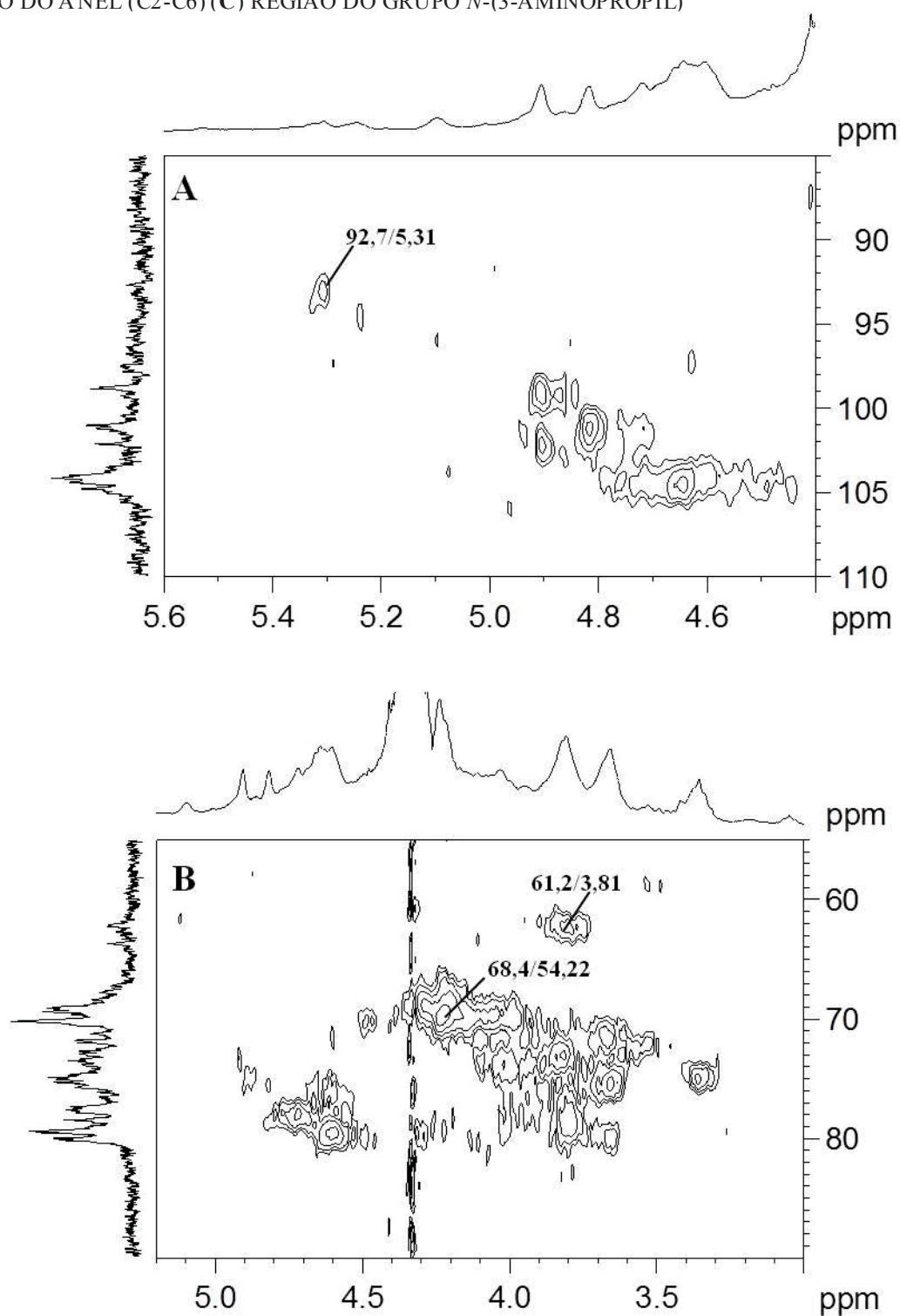
TABELA 39 – DOSAGEM DE CARBONO, NITROGÊNIO, SULFATO E ENXOFRE NO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO F1KD-OS E SEUS PRECURSORES (F, F1D E KS-O)

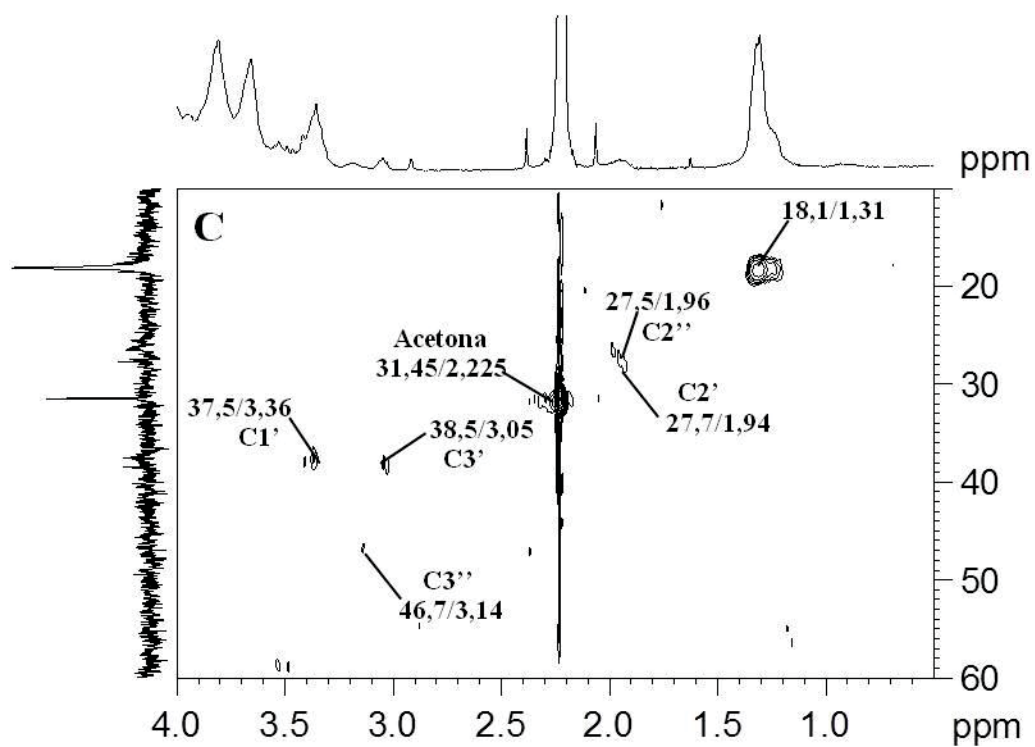
Fração	N ^a (%)	C ^a (%)	NaSO ₃ ^b (%)	S ^b (%)
KS-O	0,25	16,59	51,7	17,4
F	0,64	29,65	21,2	7,1
F1D	1,36	31,65	29,0	9,6
F1KD-OS	0,82	25,64	46,1	15,3

N%, C % e S % correspondem respectivamente aos percentuais de nitrogênio, carbono e enxofre. ^a análise elementar; ^b determinações de acordo com os métodos de DOGSON (1961). FONTE: O autor (2018).

Através das determinações de N, C e S, foi observado que após a reação de aminação redutiva, os percentuais de N e C da fração F1KD-OS diminuíram, de modo oposto ocorreu com o percentual de S. A fração nativa apresentava 7,1% de enxofre, após a ligação do oligossacarídeo KD-OS, este percentual de aumentou para 15,3%. Apresentando-se como mais uma evidência da ligação de KD-OS com a fração F1D.

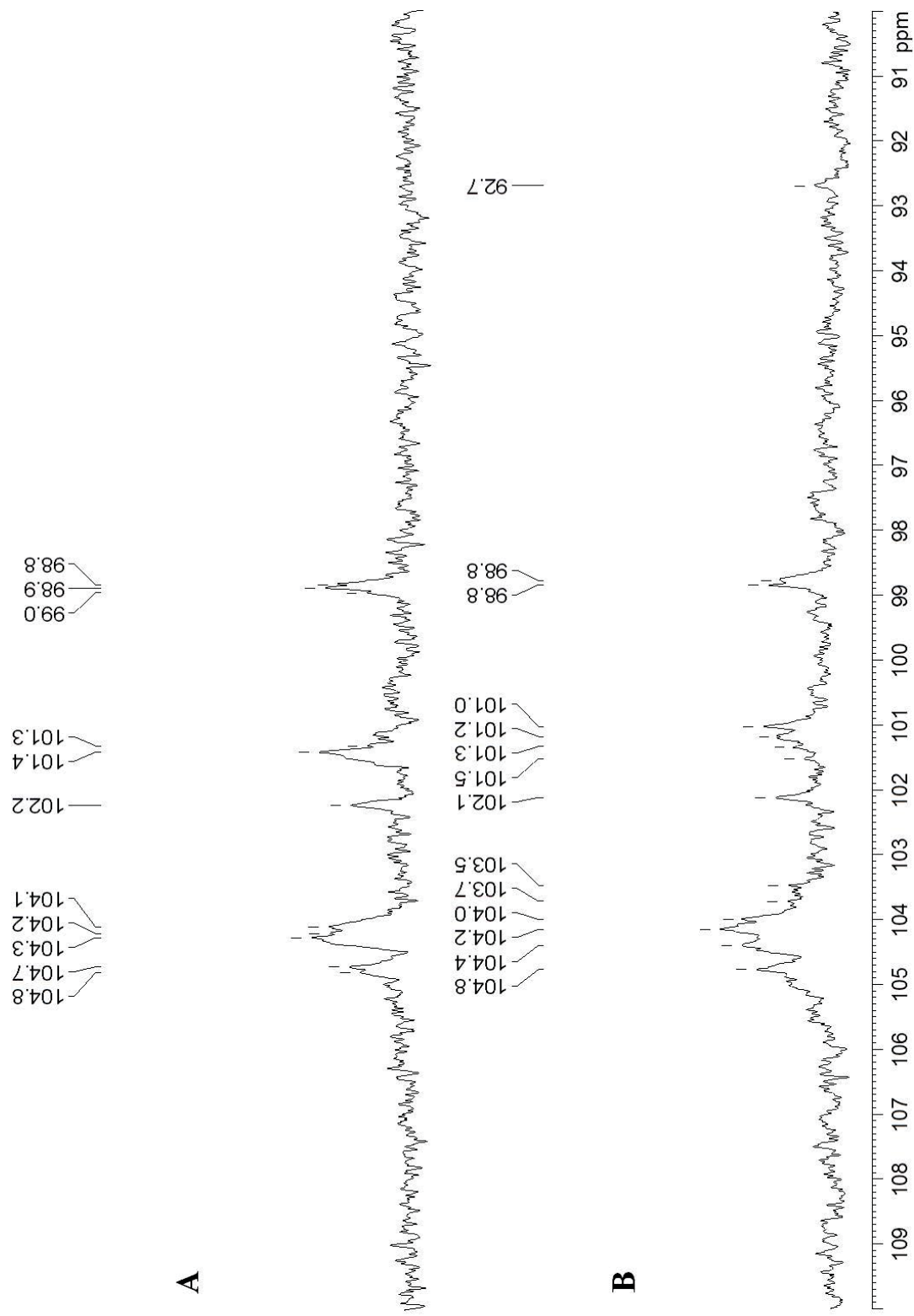
FIGURA 128 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA FRAÇÃO F1KD-OS. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6) (C) REGIÃO DO GRUPO *N*-(3-AMINOPROPIL)





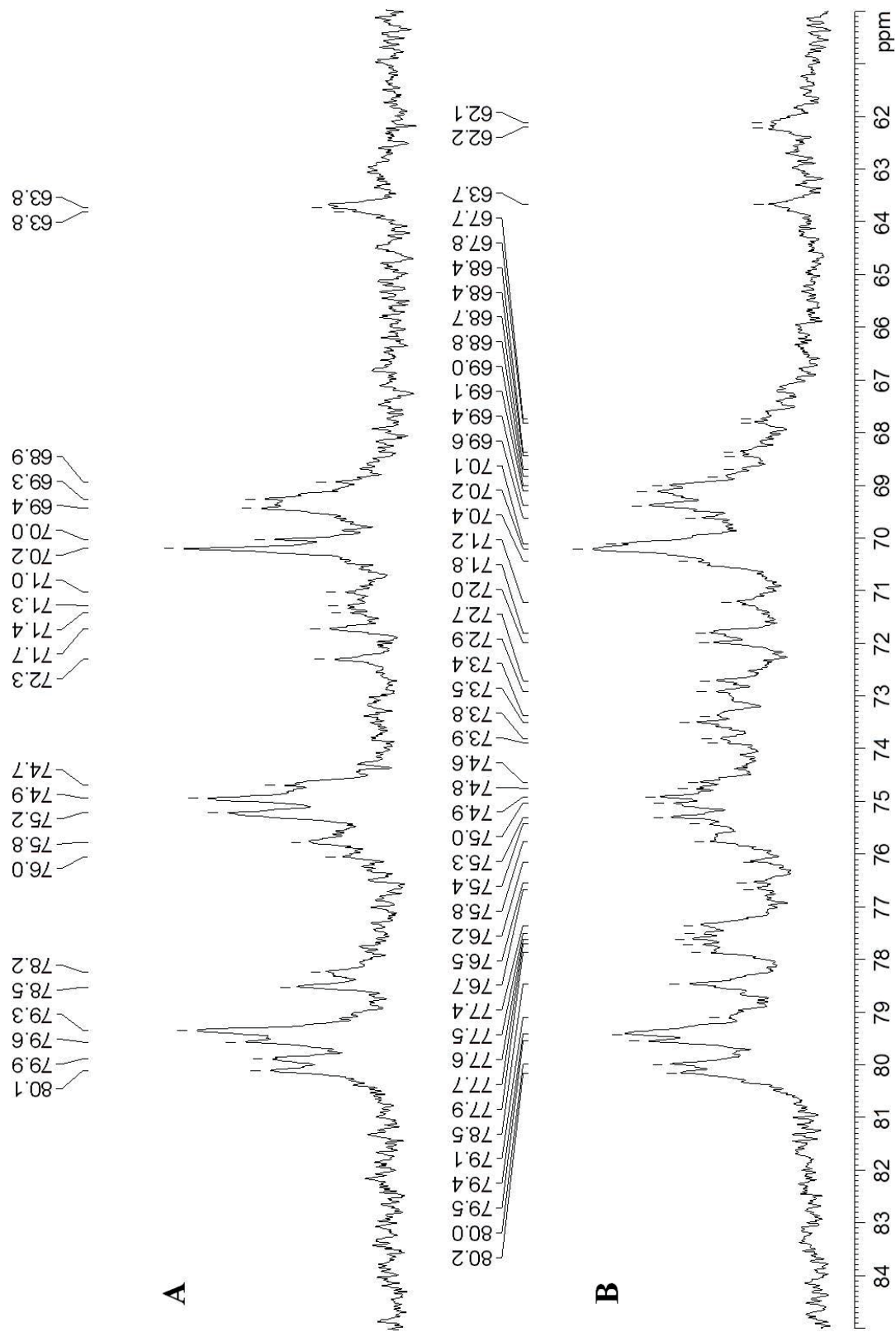
Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (31,45/2,225). FONTE: O autor (2018).

FIGURA 129 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO ANOMÉRICA DA FRAÇÃO F1D(A) E DA FRAÇÃO F1KD-OS(B)



Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (31,45). FONTE: O autor (2018).

FIGURA 130 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO DO ANEL (C2 – C6) DA FRAÇÃO FID(A) E DA FRAÇÃO FIKD-OS (B)

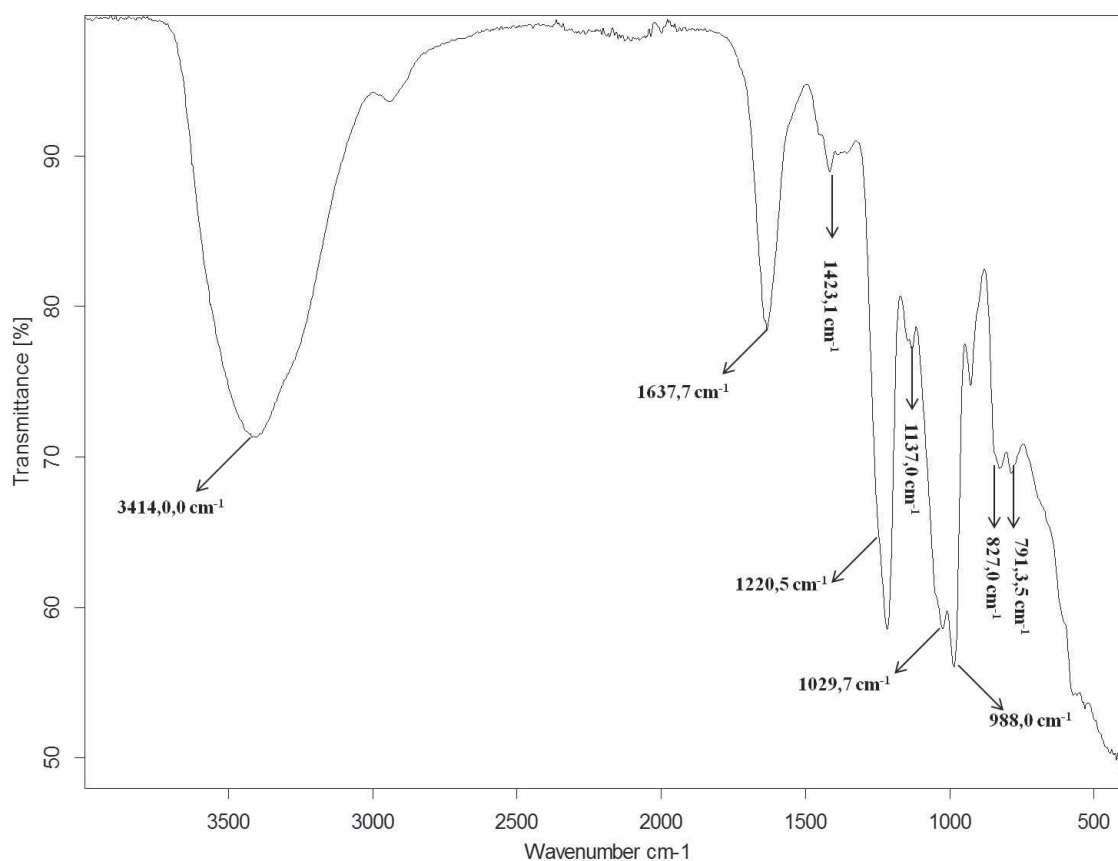


Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (31,45).. FONTE: O autor (2018).

Na FIGURA 131 apresenta o espectro de infravermelho da fração F1KD-OS. Comparando este espectro, com o espectro da sua fração precursora (FIGURA 58), observa-se o aumento da intensidade das bandas em $827,0\text{ cm}^{-1}$, característica do estiramento vibracional do grupo sulfato (C6-O-S) das unidades de β -D-galactopiranosose. Adicionalmente também foi observado o aumento significativo da intensidade da banda em $1220,5\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento vibracional assimétrico do grupo sulfato O=S=O (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003; SEKRAL; LEGRAND, 1993).

Estas atribuições as bandas confirmam a análise de RMN, indicando a presença das galactanas sulfatadas, e conseqüentemente sugerindo a ligação dos oligossacarídeos a ulvana amidada com a 1,3-propanodiamina.

FIGURA 131 – ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DA FRAÇÃO F1KDOS



Wavenumber: número de onda; *Transmittance*: transmitância. FONTE: O autor (2018).

O insucesso da produção do polissacarídeo híbrido F1KD-OS pode ter ocorrido devido ao somatório de alguns fatores, como o baixo percentual de ácidos urônico na fração F (28,2 mol %), e conseqüentemente o baixo percentual de amidação destas carboxilas. Aliados

a isto, foi a utilização de uma mistura de oligossacarídeos (KD-OS), o que dificulta a caracterização do produto final.

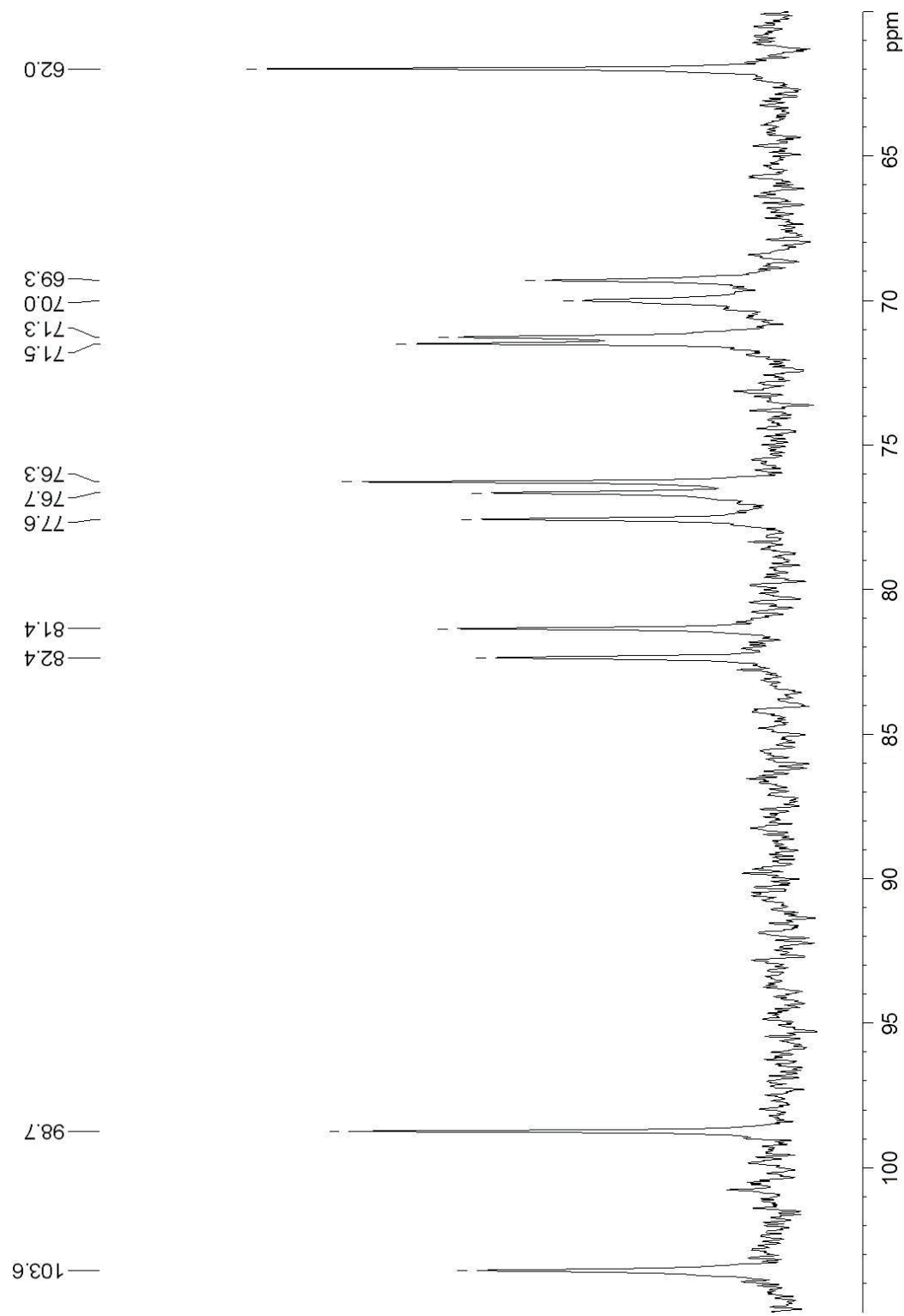
4.4 FUNCIONALIZAÇÃO DA AGAROSE

4.4.1 Caracterização química e espectroscópica da agarose

A agarose (Aga) utilizada neste trabalho foi obtida comercialmente da marca Sigma-Aldrich (CAS 9005-38-3). Para iniciar o processo de modificação química do polissacarídeo da agarose, se fez necessário reduzir as extremidades redutoras com borohidreto de sódio (NaBH_4), a fim de se evitar “*peeling*” no polissacarídeo. A redução foi realizada conforme descrito por HEUKO (2015). Esta primeira etapa gerou a fração Aga-red (93% de rendimento).

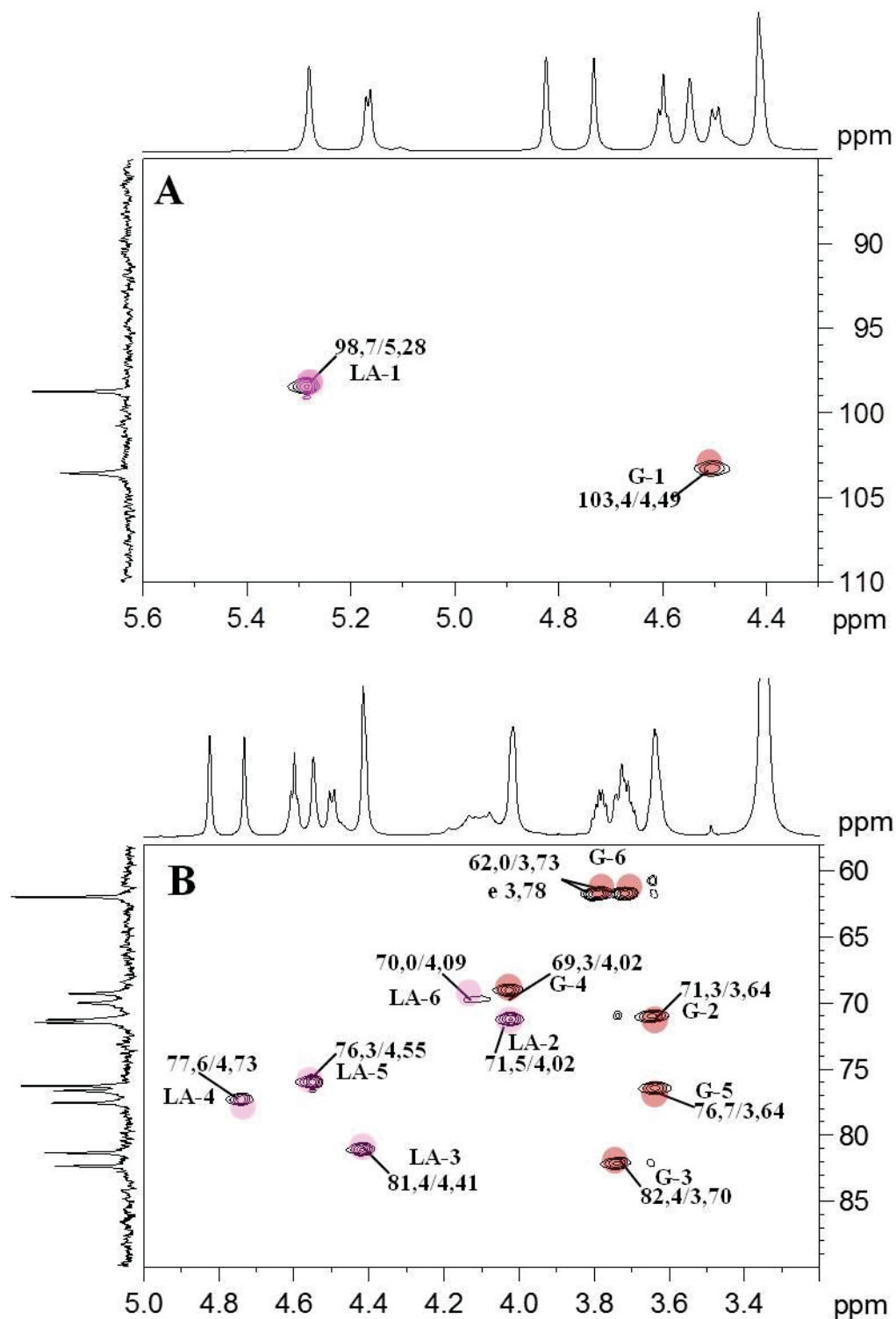
As análises de RMN de ^{13}C , ^1H e HSQC da agarose reduzida (Aga-red), forneceram espectros similares aos reportados na literatura para a agarose (HEUKO, 2015; KONDAVEETI; PRASAD; SIDDHANTA, 2013; OZA et al., 2010; SU et al., 2013; USOV; YAROTSKY; SHASHKOV, 1980). No espectro de RMN de ^{13}C e HSQC (FIGURAS 132 e 133) da fração Aga-red, foram assinalados os carbonos e hidrogênios da díade que compõem a agarose. As correlações anoméricas, em 103,6/4,49 ppm e 98,7/5,28 ppm, correspondem as unidades 3-*O*-substituídas de β -D-galactopiranosose (G) e 4-*O*-substituídas de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (LA), respectivamente (GAMINI et al. 1997; HEUKO, 2015; USOV; YAROTSKY; SHASHKOV, 1980).

Os assinalamentos dos C/H referente à díade $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-4-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-3,6-anidro-}\alpha\text{-L-Galp-(1}\rightarrow]$ (FIGURA 134), que constitui a agarose reduzida, estão apresentados na TABELA 41. Destacando-se que os assinalamentos foram realizados utilizando DMSO- d_6 tanto como solvente, como referência interna (41,53/2,696 ppm).

FIGURA 132 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO A GAROSE REDUZIDA

Solvente: $\text{DMSO-}d_6$, 70 °C; $\text{DMSO-}d_6$ como padrão interno (41,53 ppm). FONTE: O autor (2018).

FIGURA 133 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AGAROSE REDUZIDA. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6)

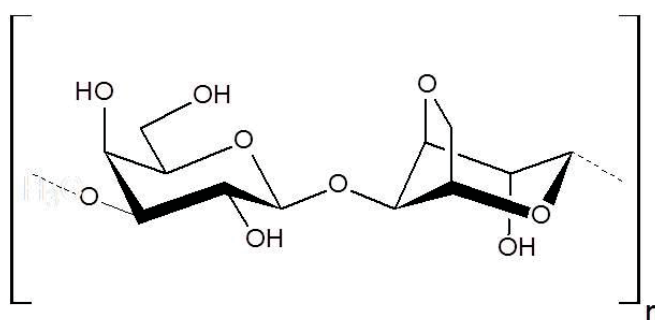


Solvente: DMSO-*d*₆, 70 °C; DMSO-*d*₆ como padrão interno (41,53/2,696). Após a nomenclatura de KNUSTEN et al., 1996, o número refere-se à posição dos C/H da respectiva unidade. G e LA = unidades de β-D-galactopiranosose e 3,6-anidro-α-L-galactopiranosose, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

TABELA 40 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS UNIDADES PRESENTES NA AGAROSE REDUZIDA

Unidade		^{13}C	^1H
G	[$\rightarrow 3$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow)]	1	103,4
		2	71,3
		3	82,4
		4	69,3
		5	76,7
		6	62,0
LA	[$\rightarrow 4$)-3,6-anidro- α -L-Galp-(1 \rightarrow)]	1	98,7
		2	71,5
		3	81,4
		4	77,6
		5	76,3
		6	70,0

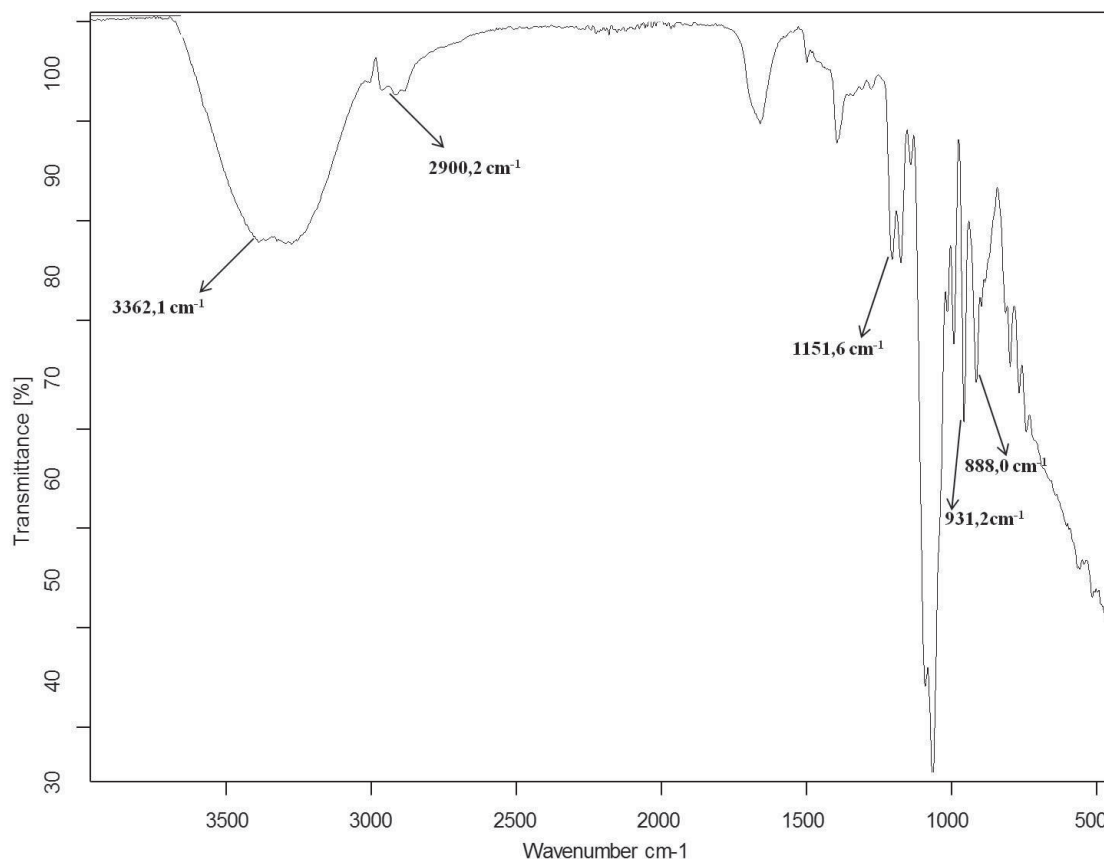
Solvente: DMSO-*d*6, 70 °C; DMSO-*d*6 como padrão interno (41,53 ppm). FONTE: O autor (2018).

FIGURA 134 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DA DÍADE [$\rightarrow 3$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -L-Galp-(1 \rightarrow)]

FONTE: O autor (2018).

O espectro de infravermelho da agarose reduzida (FIGURA 135) apresentou bandas características como: $3362,1\text{ cm}^{-1}$ (O-H estiramento vibracional), $2900,2\text{ cm}^{-1}$ (C-H estiramento vibracional), $1151,6\text{ cm}^{-1}$ (C-O estiramento vibracional) e $931,2\text{ cm}^{-1}$ (estiramento vibracional da ligação C-O-C das unidades de 3,6-anidrogactose) e $888,0\text{ cm}^{-1}$ (C-H deformação angular do carbono β anomérico) (GARCIA et al., 2000).

FIGURA 135 - ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AGAROSE REDUZIDA



Wavenumber: número de onda; Transmittance: transmitância. FONTE: O autor (2018).

Desta forma, a agarose reduzida e devidamente caracterizada foi utilizada para as reações posteriores.

4.4.2 Semissíntese de Aga-Tos

Reações de tosilação são utilizadas a fim de se transformar o polissacarídeo agarose, em um intermediário versátil para a preparação de derivados. Os grupos tosil quando ligados aos oxigênios das hidroxilas de polissacarídeos, tornam-se excelentes grupos de saída em reações de substituição nucleofílica (SN), podendo ser substituídos por inúmeros grupos, como por exemplo, azida ou aminas (ELCHINGER et al., 2012; GERICKE et al., 2012; GERICKE; HEINZE, 2015; HEINZE et al., 2001; SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014).

HEUKO (2015) descreveu a reação de tosilação da agarose em meio aquoso (heterogêneo), fazendo uso do ácido *p*-toluenosulfônico e acetonitrila. O autor (2015), obteve diferentes graus de substituição do grupo tosil (DS_{tos}), desde 0,04 até 0,86. Adicionalmente, HEUKO (2015) observou substituições pelo grupo tosil, principalmente nas hidroxilas

primárias (C6 das unidades de β -D-galactopiranosose).

Este maior grau de substituição das hidroxilas primárias esta de acordo com o relatado na literatura. A agarose possui quatro hidroxilas passíveis de tosilção, as quais apresentam diferentes reatividades: G-6 (hidroxila primária) > LA-2 e G-4 (hidroxilas secundárias e axiais) > G-2 (hidroxila secundária e equatorial) (GERICKE; HEINZE, 2015). GERICKE e HEINZE (2015), tosilaram a agarose em meio homogêneo, fazendo uso do solvente orgânico DMA na presença de cloreto de lítio (LiCl), obtendo um DS_{tos} de 1,81, onde a tosilção foi principalmente nas hidroxilas G-6 e LA-2.

Entretanto, mesmo apresentando um DS_{tos} menor, a condição reacional descrita por HEUKO (2015), apresenta vantagens em relação a descrita por GERICKE e HEINZE (2015), devido principalmente a não utilização tanto de solvente orgânico, como também do cloreto de lítio. Desta forma, a metodologia de tosilção descrita por HEUKO (2015) foi utilizada no presente trabalho para produzir o intermediário agarose-tosil.

Para os cálculos estequiométricos da reação, foi considerada a massa da díade [\rightarrow 3- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)3,6-anidro- α -L-Galp-(1 \rightarrow)]_n, sendo referente a 307,3 g, equivalente a 1 mol de agarose.

A reação de tosilção foi realizada em meio heterogêneo (meio aquoso), resultando na fração Aga-Tos (56,5% rendimento). Esta fração tosilada foi analisada por RMN de ^{13}C , 1H , HSQC, HSQC-editado, COSY, TOCSY e HSQC-TOCSY, a fim da identificação das posições que foram tosiladas na agarose.

No espectro de RMN de ^{13}C e HSQC (FIGURAS 136 e 137) da fração Aga-Tos, foram assinalados os carbonos e hidrogênios dos grupos tosil. Foram observadas quatro correlações: 129,2/7,99, 129,3/8,05, 131,6/7,60 e 131,8/7,67 ppm referentes aos C/H do anel fenil. Adicionalmente, o sinal em 22,7/2,61 ppm, foi atribuído ao grupo metílico presente no grupo tosil (GERICKE; HEINZE, 2015; HEINZE et al., 2001; HEUKO, 2015; SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014). No espectro de HSQC (FIGURA 138), além das correlações já descritas anteriormente em 103,6/4,50 e 98,8/5,28 ppm, como sendo as unidades de β -D-galactopiranosose (G) 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (LA), foi observada uma nova correlação anomérica em 97,0/5,46 ppm, a qual foi atribuída aos C1/H1 das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose tosiladas na posição C2. Além disto, C2/H2 substituído foi observado em 78,0/4,83 ppm (efeito alfa +7,0/0,81 ppm). Adicionalmente, um efeito beta (-7,8/+0,05 ppm) nas posições C3 das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose tosilada em C2 também foi observado (GERICKE; HEINZE, 2015; HEUKO, 2015). Estes assinalamentos foram confirmados através do espectro de RMN de COSY (ANEXO 14, pg. 339).

Através das análises de RMN de HSQC-TOSCY (ANEXO 15, pg. 340) e ^{13}C -DEPT (ANEXO 16, pg. 341), foram identificados os CH referentes à tosilção da hidroxila primária (C6) das unidades de β -D-galactopiranosose. As correlações em 70,7/4,36 e 4,22 ppm foram atribuídas aos C6/H6 das unidades β -D-galactopiranosose tosiladas em C6 (efeito alfa de +8,7/+0,58 e 0,49 ppm). Adicionalmente, um efeito beta de -3,5/+0,3 ppm foi observado nos C5/H5 das unidades β -D-galactopiranosose tosiladas em C6 (GERICKE; HEINZE, 2015; HEUKO, 2015). Entretanto, ainda foram observados sinais referentes aos C6/H6 e C2/H2 das unidades de β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose sem tosilção, em 62,0/3,78/3,73 e 71,0/4,01 ppm, respectivamente (GAMINI et al. 1997; HEUKO, 2015; α USOV; YAROTSKY; SHASHKOV, 1980).

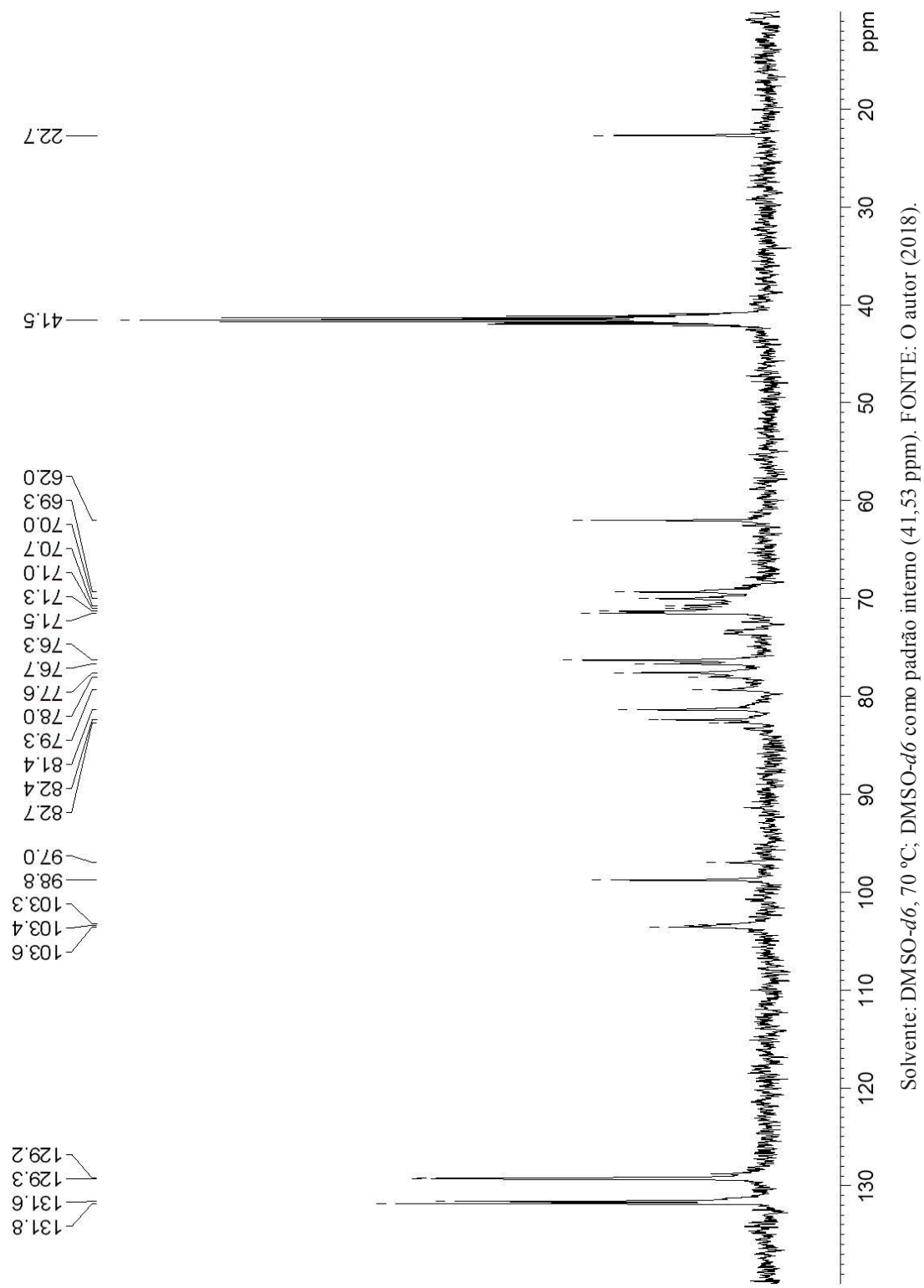
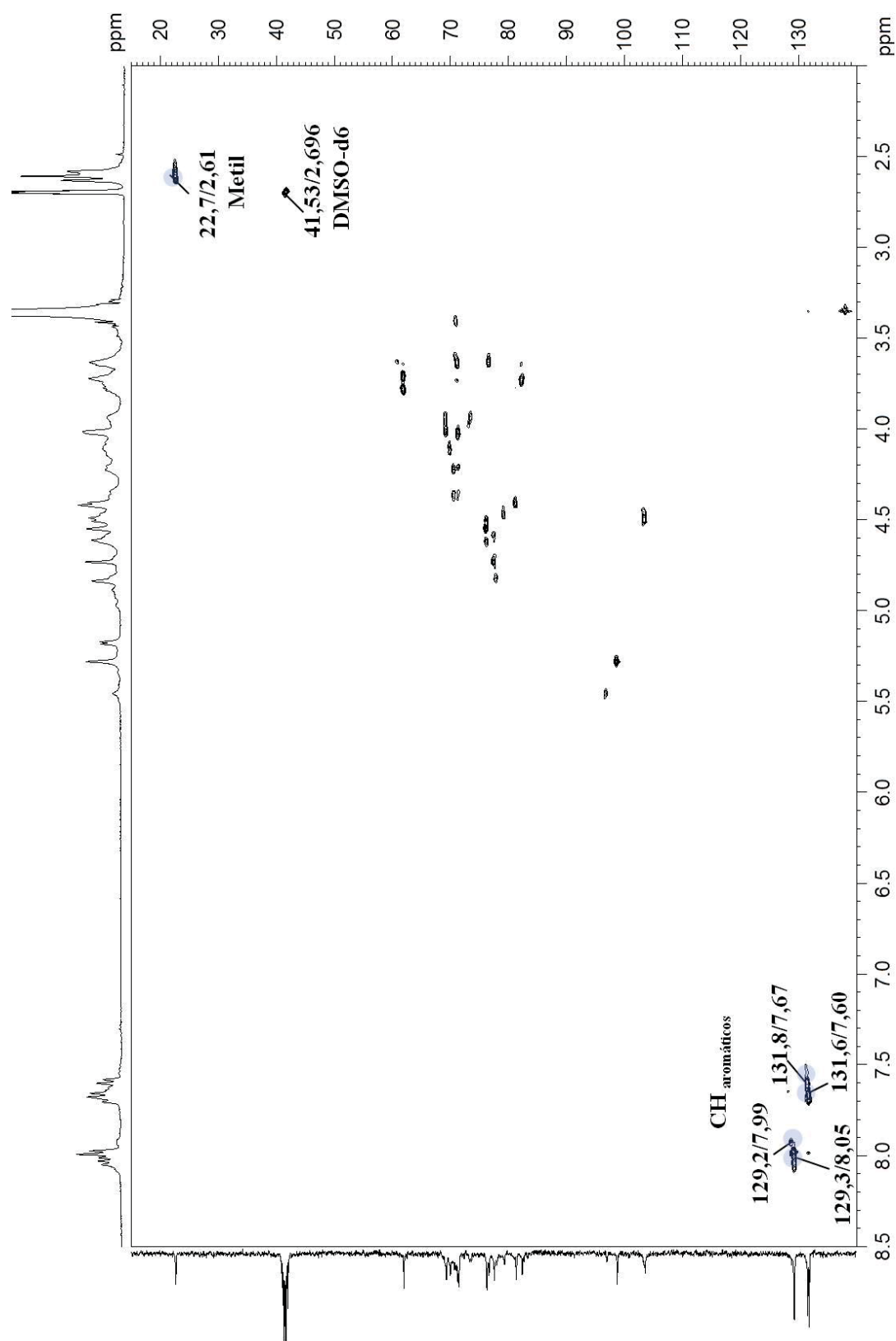
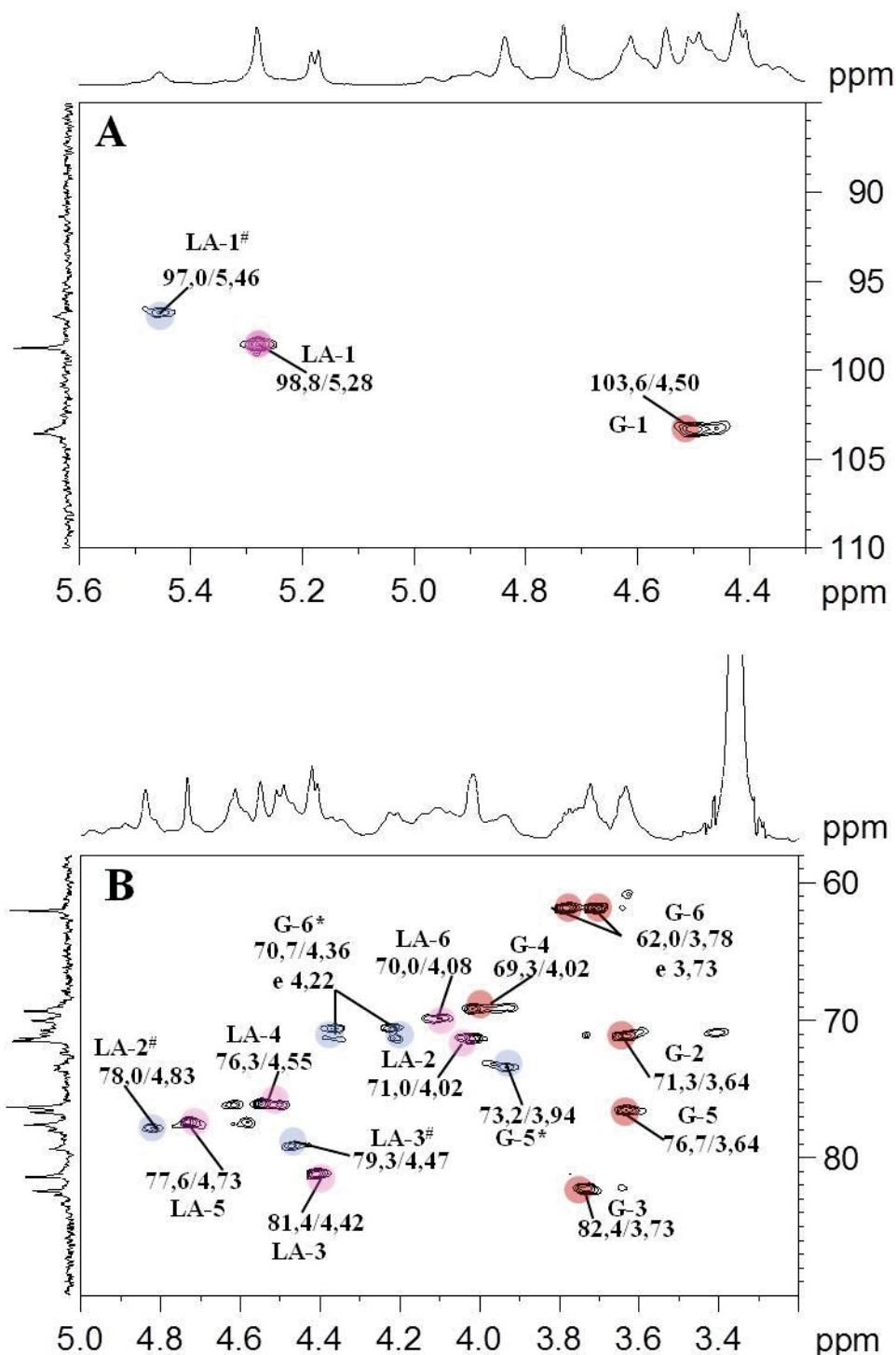
FIGURA 136 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA AGA-TOS

FIGURA 137 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AGA-TOS



Solvente: DMSO-*d*6, 70 °C; DMSO-*d*6 como padrão interno (41,53/2,696 ppm). FONTE: O autor (2018).

FIGURA 138 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AGA-TOS (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6)



Solvente: DMSO-*d*₆, 70 °C; DMSO-*d*₆ como padrão interno (41,53/2,696 ppm). Após a nomenclatura de KNUSTEN et al., 1996, o número refere-se à posição dos C/H da respectiva unidade. G (●) e LA (●), correspondem as unidades de β-D-galactopiranoose e 3,6-anidro-α-L-galactopiranoose sem modificação química respectivamente. G* (●) e LA[#] (●) correspondem as unidades de β-D-galactopiranoose e 3,6-anidro-α-L-galactopiranoose tosiladas nas hidroxilas G-6 e LA-2, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

Os assinalamentos das unidades constituintes do polissacarídeo agarose tosilada Aga-TOS estão apresentados na TABELA 43.

TABELA 41 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES PRESENTES EM AGA-TOS

Unidade		^{13}C	^1H
G	[$\rightarrow 3$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow)]	1	103,6
		2	71,3
		3	82,4
		4	69,3
		5	76,7
		6	62,0
G*	[$\rightarrow 3$)- β -D-Galp-6- <i>p</i> -toluenosulfonato-(1 \rightarrow)]	5*	73,2
		6*	70,7
LA	[$\rightarrow 4$)-3,6-anidro- α -L-Galp-(1 \rightarrow)]	1	98,8
		2	71,0
		3	81,4
		4	76,3
		5	77,6
		6	71,0
LA[#]	[$\rightarrow 4$)-3,6-anidro- α -L-Galp-2- <i>p</i> -toluenosulfonato-(1 \rightarrow)]	1 [#]	97,0
		2 [#]	78,0
		3 [#]	79,3

Solvente: DMSO-*d*6, 70 °C; DMSO-*d*6 como padrão interno (41,53 ppm) G, G*, LA e LA[#] correspondem as unidades de β -D-galactopirranose, β -D-galactopirranose tosilada em C6, 3,6-anidro- α -L-galactopirranose e 3,6-anidro- α -L-galactopirranose tosilada em C2, respectivamente. FONTE: O autor (2018).

O cálculo do grau de substituição (DS_{Tos}) foi determinado pelo espectro de RMN de ^1H (FIGURA 139), através da relação entre a área de integração dos grupos aromáticos (do grupo tosil) e do H1 das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopirranose, divididas pelo número de hidrogênios de cada sinal. Este cálculo foi baseado na equação descrita por ZHAO e colaboradores (2012), para se determinar o DS_{Tos} da celulose. Adicionalmente foram calculadas as relação entre as unidades tosiladas e não tosiladas em: C2 de 3,6-anidro- α -L-galactopirranose e C6 de β -D-galactopirranose.

Considerando:

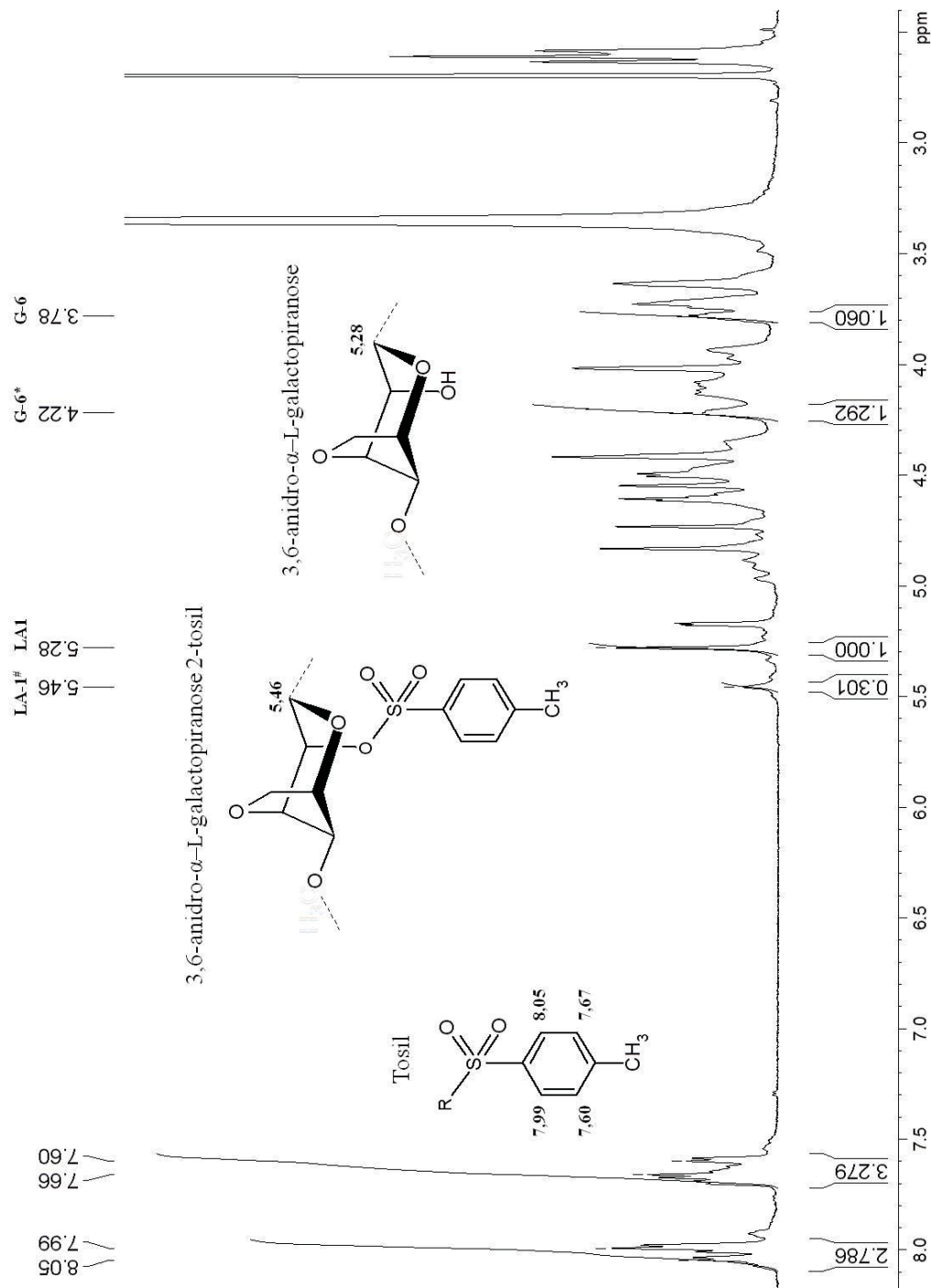
- CH aromáticos $\rightarrow (2,786 + 3,279)/4\text{H} \rightarrow 1,52$
- CH anomérico de 3,6-anidro- α -L-galactopirranose $\rightarrow 1,00$
- CH anomérico de 3,6-anidro- α -L-galactopirranose-2-tosil $\rightarrow 0,301$
- CH de C6 de β -D-galactopirranose $\rightarrow 1,060$
- CH de C6 de β -D-galactopirranose 6-tosil $\rightarrow 1,292$

Destaca-se que através do cálculo de DS_{Tos} , a fração Aga-Tos apresentou um DS de 1,13. O valor de DS_{Tos} obtido no presente trabalho, foi superior aos valores reportados por HEUKO, 2015, entretanto menor que o de GERICKE et al 2015.

$$DStos = \frac{1,41}{0,5001,00 + 0,242} = 1,13$$

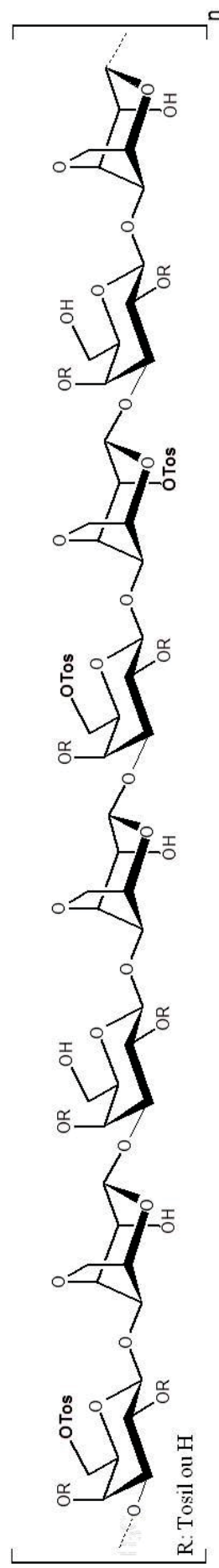
Adicionalmente, através das relações das áreas de integração dos sinais referentes as unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose e β -D-galactopiranosose, foram obtidas as relações o percentual de unidades tosiladas em C2 e C6 das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose e β -D-galactopiranosose , respectivamente. Desta forma, a cada 8 unidades monossacarídicas (4 díades de G-LA), uma esta tosilada em C2 e duas estão tosiladas em C6, apresentando 25 e 50% de tosilção aproximadamente.

A FIGURA 140 ilustra uma estrutura hipotética da agarose tosilada, principalmente nas posições C6 e C2 das unidades de β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, respectivamente.

FIGURA 139 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H INTEGRADO DA AGA-TOS PARA O CÁLCULO DE DS_{TOS} 

Solvente: $\text{DMSO-}d_6$, 70°C ; $\text{DMSO-}d_6$ como padrão interno (2,696 ppm). G-6 e LA-1 correspondem a H6 e H1 das unidades de β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose sem modificação química em C6 e C2, respectivamente. G-6 $^\#$ e LA-1 $^\#$ correspondem a H6 e H1 das unidades de β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose tosiladas em C6 e C2, respectivamente. R representa a estrutura do dissacarídeo da agarose (G-LA). FONTE: O autor (2018).

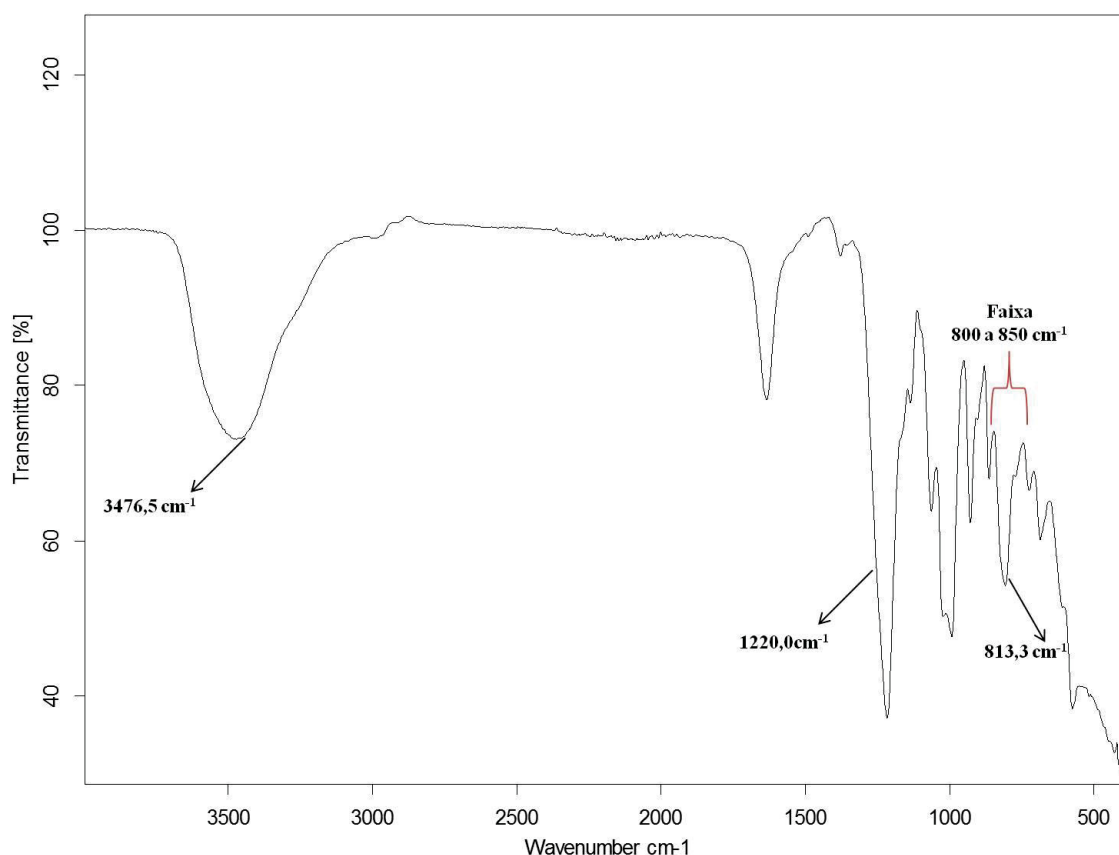
FIGURA 140 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA HIPOTÉTICA DA AGA-TOS



Tos: Tosil. FONTE: O autor (2018).

O espectro de infravermelho da fração Aga-Tos (FIGURA 141) apresentou uma mudança no perfil da absorbância da banda em $1173,9\text{ cm}^{-1}$, quando comparado a agarose nativa (Aga). Esta banda foi atribuída ao estiramento simétrico do grupo (O=S=O) referente ao grupo tosil (GERICKE et al., 2012; GERICKE; HEINZE, 2015; HEUKO, 2015).

FIGURA 141 – ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DA AGAROSE TOSILADA



Wavenumber: número de onda; *Transmittance*: transmitância. FONTE: O autor (2018).

A partir dos resultados aqui apresentados e discutidos, conclui-se que a agarose foi tosilada, principalmente nas posições C2 e C6 das unidades 3,6-anidro- α -L-galactopirranose e de β -D-galactopirranose, respectivamente, transformando a agarose em um bom intermediário para produção de biomateiras funcionalizados com diferentes grupos químicos.

4.4.3 Semissíntese de Aga-Dap

As reações de substituição nucleofílicas são comumente utilizadas em síntese orgânica. No presente trabalho foi utilizado a diamina DAP (1,3-propanodiamina)(nucleófilo) para realizar a substituição do grupo tosil (grupo abandonador). Este tipo de reação ocorre através de um processo SN_2 , no qual a velocidade de reação é proporcional à concentração do

substrato e do nucleófilo, bem como a temperatura. Reações com temperaturas mais elevadas ocorrem mais rapidamente, devido a energia de ativação necessária para ocorrer a substituição do grupo tosil.

Na literatura existem trabalhos que realizaram a substituição do grupo tosil por aminas, azida e 1,2-etilenodiamina (GERICKE; HEINZE, 2015; SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014; HEUKO 2015), 1,2-etilenodiamina (GERICKE; HEINZE, 2015; SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014).

Desta forma, a agarose tosilada foi submetida à reação de substituição nucleofílica (SN_2), com a DAP. Para os cálculos estequiométricos da reação, foi considerada a massa de uma díade (G-LA) tosilada, onde 1 mol equivale a 461,5 g.

A reação de aminação foi realizada em meio homogêneo (meio orgânico DMFa), resultando no produto Aga-Dap (62,0% rendimento de recuperação). A fração aminada da agarose (Aga-Dap) foi analisada por RMN de ^{13}C , 1H , HSQC e COSY. A substituição nucleofílica dos grupos tosil pela DAP, conferiu solubilidade em meio aquoso ao material (Aga-Dap), sendo possível realizar as análises de RMN em D_2O e acetona como padrão interno.

Através da análise de RMN de HSQC da fração Aga-Dap, foi possível assinalar os C/H anoméricos das unidades de β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose constituintes da díade G-LA, em 102,7/4,61 e 98,6/5,19 ppm, respectivamente, como demonstrado na FIGURA 11 (A).

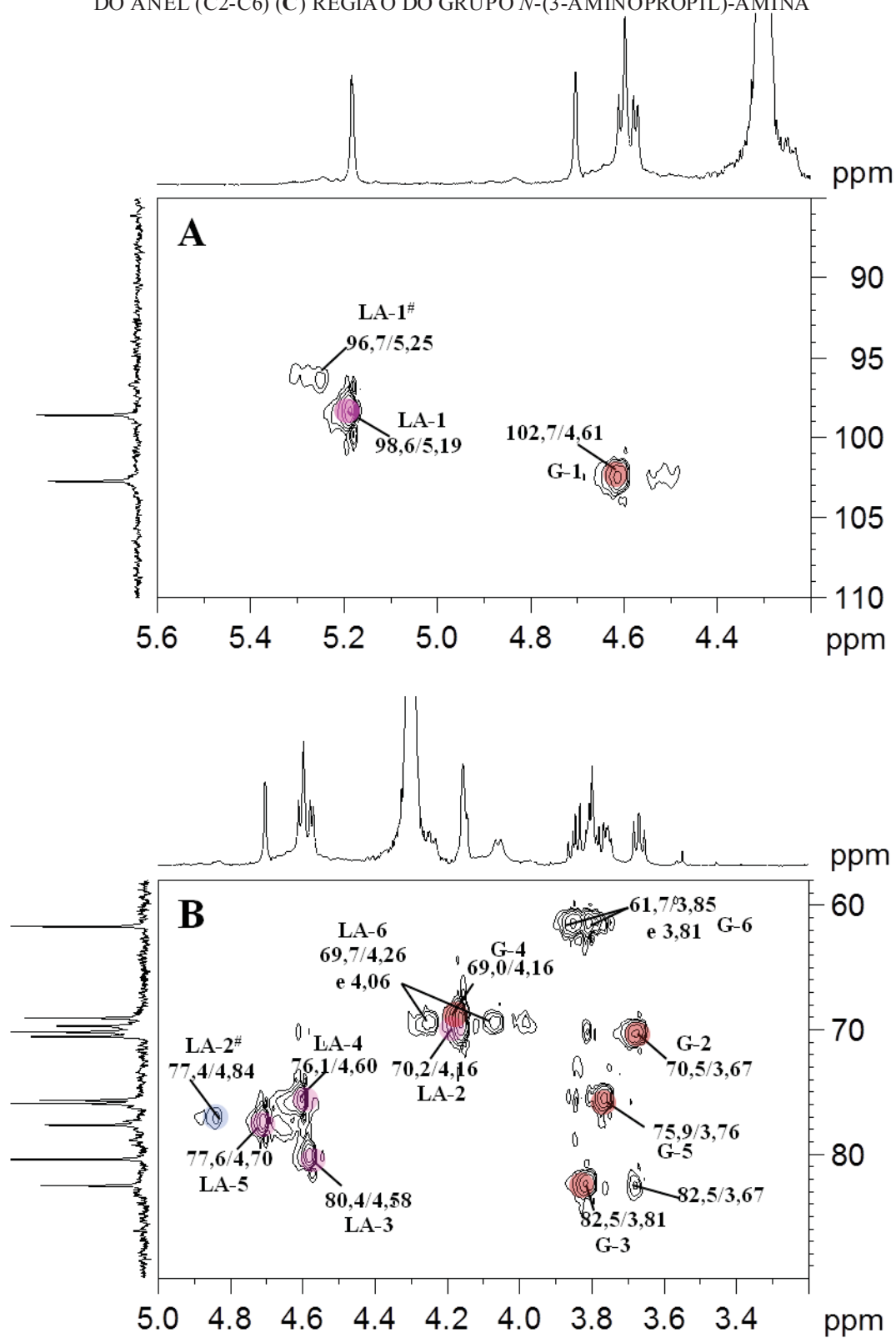
O espectro de RMN de HSQC (FIGURA 142 C) mostrou novos sinais, com relação ao espectro de RMN de HQSC da fração Aga-Tos. O sinal em 49,3/3,06 e 2,94 ppm foi atribuído ao C6 das unidades de β -D-galactopiranosose aminados com a DAP. Estes assinalamento está de acordo com valores de C/H reportados para unidades primárias aminadas (DUCATTI, 2009; GERICKE; HEINZE, 2015; ORSATO, 2007).

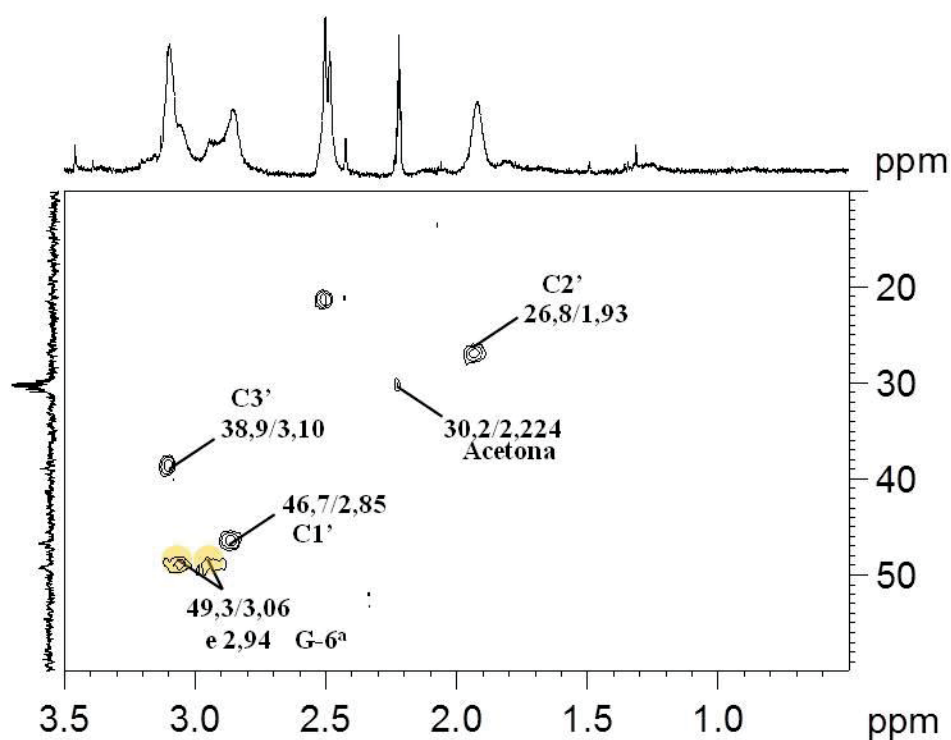
Adicionalmente, os sinais em 46,7/2,85, 38,9/3,10 e 26,8/1,93 ppm foram atribuídos aos C/H da 1,3-propanodiamina ligada. A correlação em 46,7/2,85 ppm corresponde ao C1'/H1' (agarose-NHCH₂CH₂CH₂NH₂) do grupo *N*-(3-aminopropil)-amina, e as correlações em 38,9/3,10 e 26,8/1,93 ppm foram atribuídas ao C3'/H3' (agarose-NHCH₂CH₂CH₂NH₂) e C2'/H2' (agarose-NHCH₂CH₂CH₂NH₂) do grupo *N*-(3-aminopropil)-amina, respectivamente (GERICKE; HEINZE, 2015). Estes assinalamentos foram confirmados pela análise de RMN homonuclear $^1H/^1H$ de COSY (ANEXO 17, pg. 342), onde tanto o próton 3,10 ppm como 2,85 ppm correlacionam com o próton 1,93 ppm.

Ainda foram observadas (FIGURA 142 **A** e **B**) correlações referentes a substituição de grupos tosil na agarose, em 96,7/5,25 e 77,4/4,84 ppm, as quais foram atribuídas respectivamente aos C1/H1 e C2/H2, das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, tosiladas em C2. Entretanto não foram observadas correlações referentes a tosilção em C6 nas unidades de β -D-galactopiranosose, indicando a completa substituição dos grupos tosil nesta posição. Além disto, nos espectros das FIGURAS 143 e 144, foram observadas os sinais referentes ao grupo tosil, 128,7/7,93, 131,0/7,56 e 22,7/2,51 ppm, os quais foram atribuídos aos C/H aromáticos e ao grupo metílico, respectivamente (GERICKE; HEINZE, 2015; HEUKO, 2015).

Os assinalamentos das unidades constituintes de Aga-Dap estão apresentados na TABELA 45.

FIGURA 142 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AGA-DAP. (A) REGIÃO ANOMÉRICA (B) REGIÃO DO ANEL (C2-C6) (C) REGIÃO DO GRUPO *N*-(3-AMINOPROPIL)-AMINA





Solvente: D₂O, 70 °C; Acetona como padrão interno (30,2/2,224 ppm). Após a nomenclatura de KNUSTEN et al., 1996, o número refere-se à posição dos C/H da respectiva unidade. G (●) e LA (●), correspondem as unidades de β-D-galactopiranosose e 3,6-anidro-α-L-galactopiranosose sem modificação química, respectivamente. G^a (●) correspondem as unidades de 6-amino-6-desoxi-β-D-Galp com a Dap e LA[#] (●) correspondem as unidades de 3,6-An-α-L-Galp-2-*p*-toluenosulfonato. FONTE: O autor (2018).

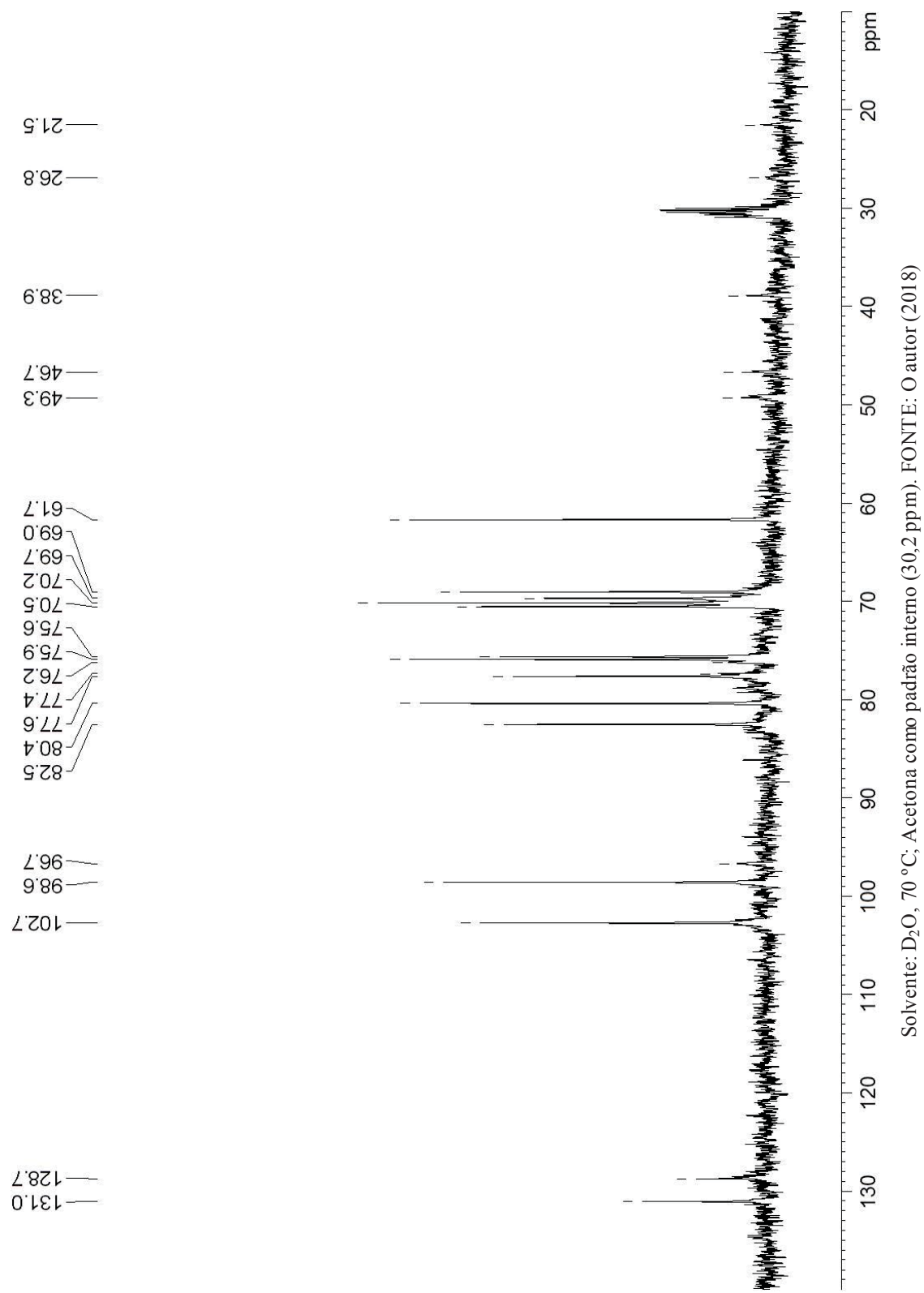
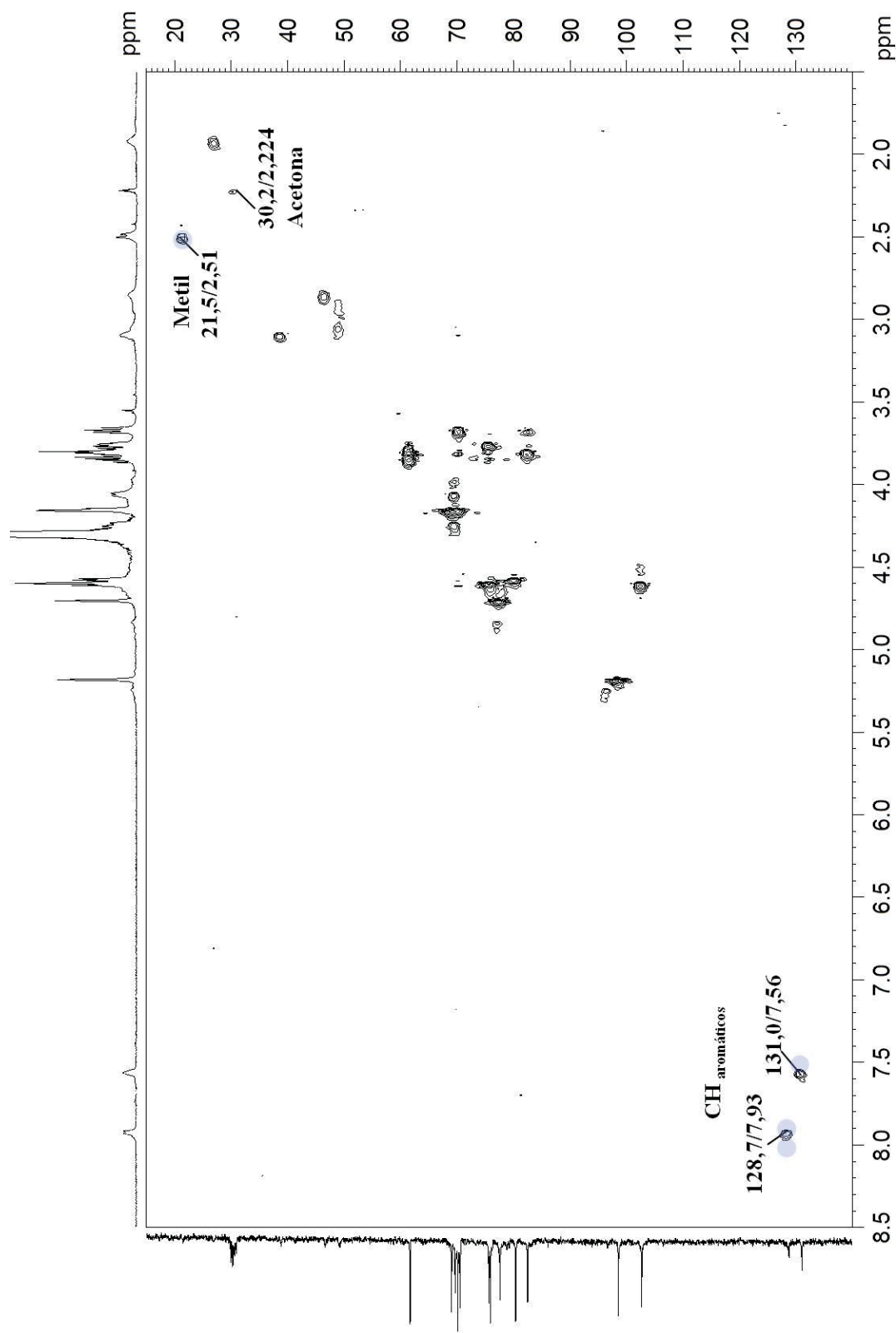
FIGURA 143 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA A GA -DAP

FIGURA 144 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA AGA-DAP



Solvente: D_2O , 70 °C; Acetona como padrão interno (30,2/2,224 ppm). FONTE: O autor (2018)

TABELA 42 – ASSINALAMENTOS DOS $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ DAS PRINCIPAIS UNIDADES PRESENTES EM A GA - DAP

Unidade		^{13}C	^1H
G	[$\rightarrow 3$)- β -D-Galp-(1 \rightarrow)]	1	102,7
		2	70,5
		3	82,5
		4	69,0
		5	75,9
		6	61,7
G^a	[$\rightarrow 3$)-6-amino-6-desoxi- β -D-Galp-(1 \rightarrow)]	6 ^a	49,3
LA	[$\rightarrow 4$)-3,6-anidro- α -L-Galp-(1 \rightarrow)]	1	98,6
		2	70,2
		3	80,4
		4	76,1
		5	77,6
		6	69,7
LA[#]	[$\rightarrow 4$)-3,6-anidro- α -L-Galp-2- <i>p</i> -toluenosulfonato-(1 \rightarrow)]	1 [#]	96,7
		2 [#]	77,4
DAP	<i>N</i> ' <i>N</i> '-propil	C1'	46,7
		C2'	26,8
		C3'	38,9

Solvente: D₂O, 70 °C; Acetona como padrão interno (30,2/2,224 ppm) G, G^a, LA e LA[#] correspondem as unidades de β -D-galactopirranose, 6-amino-6-desoxi- β -D-galactopirranose, 3,6-anidro- α -L-galactopirranose e 3,6-anidro- α -L-galactopirranose-2-*p*-toluenosulfonato, respectivamente. DAP corresponde a 1,3-propanodiamina. FONTE: O autor (2018).

O percentual de aminação da agarose foi calculado utilizando a equação descrita por TAUBNER; MAROUNEK e SYNYTSYA (2017). Apesar da equação ter sido descrita para o percentual de amidação do alginato de sódio, a equação contempla tanto o número de carbonos e nitrogênios presentes na amina inserida no polissacarídeo, como o número de carbonos e presente nos monossacarídeos. Adicionalmente, os monossacarídeos presentes no alginato de sódio e na agarose, possuem 6 carbonos, sendo possível a aplicação deste cálculo para a agarose aminada.

Desta forma, a quantificação desta reação de aminação teve o auxílio da análise elementar de nitrogênio (N) e carbono (C) total. A partir das percentagens de nitrogênio (N %) e carbono (C %), as massas moleculares do N (14 g.mol⁻¹) e do C (12 g.mol⁻¹), junto com

a relação do número de átomos de carbonos e hidrogênios presentes em cada amina utilizada, a seguinte equação, foi utilizada para determinar o grau de substituição por aminas (DA):

$$DA = \frac{N.12.6}{C.n.14 - N.c.12} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

N e *C* – percentual de nitrogênio e carbono; *n* e *c* – número de átomos de nitrogênio e de carbono da amina.

Foram calculadas as determinações do DA, tanto da fração aminada (Aga-Dap), como as precursoras (Aga e Aga-Tos) como descrito na TABELA 46. Destaca-se a ausência de DA_{Am} para as frações nativa e tosilada da agarose, e a diminuição do percentual de carbono da fração Aga-TOS, é devido a inserção dos grupos tosil, os quais apresentam enxofre e oxigênio, diminuindo desta maneira o percentual de carbono. Adicionalmente a fração aminada apresentou 15,6 mol % de substituição, condizente com o percentual de tosilação da fração Aga-Tos, pois o DS_{Tos} era de 1,13 sendo referente a aproximadamente 28,3 mol % do polissacarídeo tosilada. Após a reação de aminação, dos 28,3 mol % das hidroxilas tosiladas, 15,6 mol % foram substituídas pela DAP, e os 12,7 mol % restante dos grupos tosil ou foram substituídos por hidroxilas ou continuam na forma de tosil, uma vez que as análises de RMN mostraram a presença de tosil remanescente.

Adicionalmente, os 15,6 mol % de aminação estão presentes majoritariamente na posição C6 das unidades de β-D-galactopiranosose uma vez que não foram observadas correlações referentes a substituição na posição C2 das unidades de 3,6-anidro-α-L-galactopiranosose.

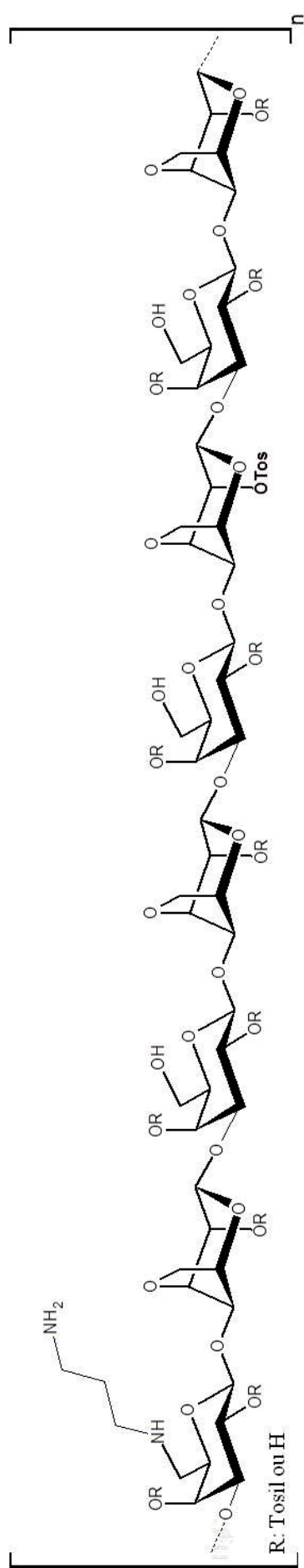
TABELA 43 – ANÁLISE ELEMENTAR DA AGAROSE AMINADA (AGA-DAP) E SEUS PRECURSORES (AGA, AGA-TOS)

Fração	N (%)	C (%)	DA (mol %)
Aga	0,02	40,34	-
Aga-Tos	0,05	20,82	-
Aga-Dap	2,32	41,15	15,6

* N% e C % corresponde aos percentuais de nitrogênio e carbono. DA grau de substituição de amino a cada 1 mol. FONTE: O autor (2018).

A FIGURA 145 ilustra uma estrutura hipotética da agarose aminada majoritariamente na posição C6 das unidades de β-D-galactopiranosose e tosiladas nas posições C2 das unidades de 3,6-anidro-α-L-galactopiranosose.

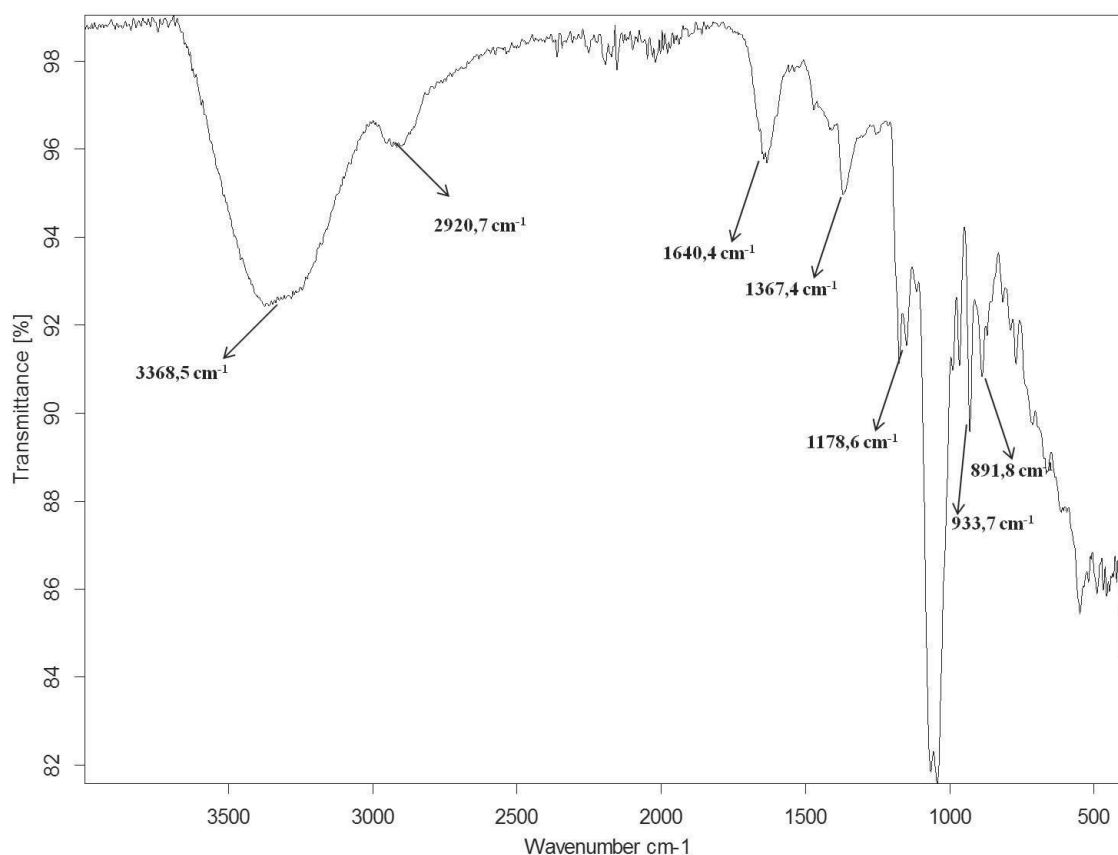
FIGURA 145 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA HIPOTÉTICA DA AGAROSE AMINADA



R: Tos ou H. FONTE: O autor (2018).

O espectro de infravermelho Aga-Dap (FIGURA 146) não apresentou mudanças significativas nas bandas de transmitância, quando comparadas as amostras precursoras (Aga e Aga-Tos). Este resultado pode ser devido ao baixo grau de substituição da molécula pelo grupo amino (DAP), não sendo significativo estas mudanças nas bandas de absorbância.

FIGURA 146 – ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DA AGAROSE AMINADA



Wavenumber: número de onda; *Transmittance*: transmitância. FONTE: O autor (2018).

A partir dos resultados aqui apresentados e discutidos, conclui-se que a agarose aminada apresenta 15,6 mol % da 1,3-propanodiamina substituída majoritariamente na posição C6 das unidades de β -D-galactopirranose. Este material funcionalizado com a DAP pode ser utilizado para produção de polissacarídeos híbridos a partir de semissínteses, produzindo biomateriais com ampla aplicação.

A agarose funcionalizada é um excelente material para produção de novos biomateriais, entretanto foram realizadas diversas tentativas de ligar covalentemente diferentes estruturas (não demonstrados) tanto na Aga-Tos, como na Aga-Dap.

A partir da Aga-Tos, foram realizadas reações de substituição nucleofílica com aminoácidos (arginina e alanina) e monossacarídeos (glucosamina). Entretanto, os

espectros de RMN de HSQC (dados não demonstrados) se mostraram complexos, de difícil análise e interpretação com as reações utilizando os aminoácidos. Já nas reações de substituição pela glucosamina, não foram observados sinais nos espectros de RMN que indicassem a ligação entre a glucosamina e a agarose.

Adicionalmente, foram realizados experimentos preliminares de reações de aminação redutiva utilizando a fração Aga-Dap e a carrabiose 4²-sulfato (KD) (dados não demonstrados). A reação entre KD de Aga-Dap, apresentava sinais referentes a C1 das unidades de 3,6-anidro-L-galactose aminada (50,2/3,32 ppm). Entretanto, apesar da evidência de ligação, não foi possível reproduzir esta reação.

Apesar de não ter sido produzido polissacarídeos híbridos a partir da amino-agarose, este intermediário pode ser utilizado como suporte, ou como resinas em colunas cromatográficas, devido a presença de cargas positivas.

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho diferentes tipos estruturais de polissacarídeos, obtidos de macroalgas marinhas, foram modificados quimicamente através de reações de hidrólise parcial ácida, sulfatação química, amidação, aminação redutiva, tosilação e aminação. As principais conclusões do presente trabalho estão listadas a seguir.

A reação de sulfatação química da kappa-carragenana obtida da macroalga *Kappaphycus alvarezii*, se mostrou eficiente mesmo na ausência do reagente 2M-2B, originando um produto persulfatado, mas com maior taxa de despolimerização em comparação com a reação em presença de 2M-2B.

A reação de sulfatação química em escala preparativa ocorreu preferencialmente nas hidroxilas primárias (C6) das unidades de β -D-galactopiranosose (100%), e nas hidroxilas secundárias (C2) das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (aproximadamente 90%).

A partir da hidrólise ácida parcial da kappa-carragenana e da kappa-carragenana sulfatada quimicamente foi obtida a carrabiose 4²-sulfato e uma mistura de oligossacarídeos sulfatados, respectivamente.

Produtos de menor massa molecular, blocos homopoliméricos constituídos por unidades de ácido β -D-manurônico (BM) e ácido α -L-gulurônico (BG) foram obtidos a partir do alginato de sódio, com alto grau de pureza e bons rendimentos de recuperação.

Reações de amidação do alginato de sódio, utilizando a DAP, permitiram a obtenção deste poliuronídeo com 22% dos grupos carboxilas modificados.

O percentual de amidação do bloco BG foi similar ao obtido para o alginato de sódio e 1,5 vezes maior que o obtido para o bloco BM.

A partir do alginato de sódio, blocos BM e BG amidados foram obtidos os correspondentes derivados híbridos, através da reação de aminação redutiva com a carrabiose 4²-sulfato.

Através da otimização da reação de amidação da ulvana de *Ulva fasciata* (fração F), foram obtidos entre 18,7 – 44,5% de amidação das carboxilas, com diferentes percentuais de subprodutos. A reação preparativa de amidação da ulvana, selecionada com base no maior percentual de amidação e menor percentual de subprodutos, permitiu a obtenção de 28,2% das carboxilas modificadas. A amidação das carboxilas presentes na ulvana ocorreu preferencialmente nas unidades de ácido β -D-glucurônico. A produção do polissacarídeo híbrido a partir da ulvana amidada e os oligossacarídeos obtidos a partir da kappa-carragenana sulfatada quimicamente, através da reação de aminação redutiva, ocorreu em baixos percentuais, devido provavelmente ao baixo teor de grupos carboxílicos presentes na fração F (7% do polissacarídeo, e 28,2% dos ácidos urônicos). Análises de RMN demonstraram a presença de sinais referentes aos produtos de hidrólise da kappa-carragenana sulfatada quimicamente, indicando que a reação de aminação redutiva ocorreu, porém em baixa intensidade.

Tanto o derivado tosil da agarose como o derivado amino, foram sintetizados com sucesso. A tosilação apresentou substituição ($DS_{Tos} = 1,13$) preferencialmente em C2 e C6 das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopirranose e β -D-galactopirranose, respectivamente, enquanto a substituição pela amina ($DA = 0,16$) ocorreu exclusivamente em C6 das unidades de β -D-galactopirranose.

Desde modo no presente trabalho foram obtidos novos produtos amidados e/ou aminados com a DAP, como: Alginato-Dap, Bloco BM-Dap, Bloco BG-Dap, Ulvana-Dap e Agarose-Dap.

Adicionalmente, foram produzidos diferentes polissacarídeos híbridos e blocos BM e BG híbridos. Estes apresentaram motivos estruturais inéditos com ligação à oligossacarídeos e dissacarídeos sulfatados obtidos a partir da *kappa*-carragenana.

Destaca-se ainda que o presente trabalho abre novas fronteiras para a ligação aos produtos amidados e/ou aminados de outros tipos de compostos e/ou oligossacarídeos

redutores os quais juntamente com os obtidos neste estudo apresentam potenciais aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAGID, A. F. et al. Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. studies on direct and indirect reductive amination procedures. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 3849–3862, 1996.
- ABU-RABEAH, K. et al. Synthesis and characterization of a pyrrole-alginate conjugate and its application in a biosensor construction. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3315–3318, 2005.
- AHMED, O. M.; AHMED, R. R. Anti-proliferative and apoptotic efficacies of ulvan polysaccharides against different types of carcinoma cells in vitro and in vivo. **Journal of Cancer Science and Therapy**, v. 6, n. 6, p. 202–208, 2014.
- AL-HORANI, R., DESAI, U. Chemical sulfation of small molecules - Advances and Challenges. **Tetrahedron**, v.66, n.16, p. 2907-2918, 2010.
- ALBAN, S.; SCHAUERTE, A.; FRANZ, G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, n. 3, p. 267–276, 2002.
- ALENCAR, J. J. R.; JUNIOR, P. P. A. H.; CELINO, J. J. J. Produção fotossintética da macroalga *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyceae) cultivada em efluentes de uma fazenda de camarões marinhos. **Brazilian Journal of Aquatic Science**, v. 14, n. 2, p. 55–62, 2011.
- ANH, J. et al. Crosslinked collagen hydrogels as corneal implants: Effects of sterically bulky vs. non-bulky carbodiimides as crosslinkers. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 7796–7805, 2013.
- ANDERSON, N. S. et al. X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: double helix models for *k*- and *l*-carrageenans. **Journal of molecular biology**, v. 45, p. 85–99, 1969.
- ALVES-REZENDE, M. C. R. et al. Compatibilidade entre alginato e gesso ortodôntico: capacidade de umedecimento sob influência da desinfecção do molde . **Revista Odontológica de Araçatuba**. v.31, n. 2, p. 40-44. 2010.
- BAE, I. Y. et al. Effect of sulfation on the physicochemical and biological properties of citrus pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1980–1983, 2009.
- BARDAL, H. P. O. **Sulfatação química do polissacarídeo de goma de exsudato de *Vochysia thyrsoidea* e avaliação das atividades anticoagulantes e antitrombótica**. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.
- BARSANTI, L., GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry and Biotechnology**. CRC press Taylor & Francis, Boca Raton, 2010.
- BEDINI, E. et al. A review of chemical methods for the selective sulfation and desulfation of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 1224–1239, 2017.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19–34, 2004.

BIXLER, H. J. Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. **Hydrobiologia**, v. 326, n. 1, p. 35–57, 1996.

BIXLER, H. J.; PORSE, H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 321–335, 2011.

BO, S. et al. Sulfation and biological activities of konjac glucomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 2, p. 899–903, 2013.

BORCH, R. F.; BERNSTEIN, M. D.; DURST, H. D. The cyanohydridoborate anion as a selective reducing Agent. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 12, p. 2897–2904, 1971.

BULPITT, P.; AESCHLIMANN, D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid : Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.47, p. 152-169, 1999.

BUSCHMANN, A. H. et al. The Status of Kelp Exploitation and Marine Agronomy, with Emphasis on *Macrocystis pyrifera*, in Chile. **Advances in Botanical Research**, v. 7, p. 161-188, 2014.

CAMPANELLA, L. et al. Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 7, p 641-651, 2004.

CASTELAR, B.; REIS, R. P.; BASTOS, M. Contribuição ao protocolo de monitoramento ambiental da maricultura de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva (Areschougaceae - Rhodophyta) na baía de Sepetiba, RJ, Brasil. **Acta botanica. brasílica**, v. 23, n. 3, p. 613–617, 2009.

CENSI, R. et al. Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 680–692, 2012.

CHANG, S. C. N. et al. Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants. **Journal Biomedical Mater Research**, v. 55, n.4, p. 503-511, 2001.

CHEJARA, D. R. et al. Studies on the structure–property relationship of sodium alginate based thixotropic hydrogels. **RSC Advances**, v. 3, n. 36, p. 15744, 2013.

CHEN, T. et al. Catalytic synthesis and antitumor activities of sulfated polysaccharide from *Gynostemma pentaphyllum* Makino. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 554–560, 2011.

CHHATBAR, M. U. et al. Microwave-induced facile synthesis of water-soluble fluorogenic alginic acid derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 5, p. 527–533, 2011.

CHHATBAR, M. U. et al. Synthesis of sodium alginate based sprayable new soft gel system. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1837–1844, 2012.

CHIELLINI, F.; MORELLI, A. Ulvan: A versatile platform of biomaterials from renewable resources. **Biomaterials**, v. 4. p. 75–98, 2011.

CHIU, Y. H. et al. Inhibition of japanese encephalitis virus infection by the sulfated Polysaccharide Extracts from *Ulva lactuca*. **Marine Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 468–478, 2012.

CHOPIN, N. et al. A direct sulfation process of a marine polysaccharide in ionic liquid. **BioMed Research International**, v. 2015, p.1-9, 2015.

CHOPIN, T.; SAWHNEY, M. Seaweeds and their mariculture. **Encyclopedia of Ocean Sciences: Second Edition**, p. 317–326, 20018.

CIANCIA, M. et al. Determination of the structure of cystocarpic carrageenans from *Gigartina skottsbergii* by methylation analysis and NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 238, p. 241–248, 1993.

COLODI, F. G. **Estrutura química e atividade antiviral dos produtos de hidrólise redutiva parcial de galactanas sulfatadas do DL-híbrida isoladas da alga *Cryptonemia seminervis* (Halymeniales, Rhodophyta)** (p. 163). Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 163 p., 2011.

COLODI, F. G. **Ulvanas modificadas via amidação e aminação redutiva: semissíntese de híbridos de ulvana-*kappa*-carrabiose e atividades biológicas.** 216 f Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

CONG, Q. et al. Structure and biological activities of an alginate from *Sargassum fusiforme*, and its sulfated derivative. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 252–259, 2014.

COOK, S. L. et al. Polysaccharide food matrices for controlling the release, retention and perception of flavours. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 253–261, 2018.

DAVIS, T. A.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Research**, v. 37, n. 18, p. 4311–4330, 2003.

DE ARAÚJO, C. A. et al. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 483–491, 2013.

DE FREITAS, M. B. et al. Ulvans induce resistance against plant pathogenic fungi independently of their sulfation degree. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 384–390, 2015a.

BARDDAL, H. P. O. et al. Anticoagulant activity of native and partially degraded glycolglucuronomannan after chemical sulfation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 328–333, 2015.

DE RUITER, G. A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n. 12, p. 389–395, 1997.

DEL RÍO, M. J.; RAMAZANOV, Z.; GARCÍA-REINA, G. *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta) tank culture as biofilters for dissolved inorganic nitrogen from fishpond effluents. **Hydrobiologia**, v. 326–327, n. 1, p. 61–66, 1996.

DIDUCH, D. R. et al. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. **Arthroscopy**, v. 16, n. 6, p. 571–577, 2000.

DOS SANTOS, G. **Oxidação seletiva de carragenanas utilizando o reagente tempo e o ácido trocloreisocianúrico como co-oxidante**. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

DRAGET, K. I.; TAYLOR, C. Food Hydrocolloids Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. **Food hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 251–256, 2011.

DRUEHL, D. L. et al. Longline cultivation of some *Laminariaceae* in British Columbia, Canadá. **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 19, p. 253–263, 1988.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, p. 4337–4351, 2003.

DUARTE, M. E. R. et al. The structure of the agarose sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 2, p. 335–347, 2004.

DUARTE, M. E. R.; GORIN, P. A. J.; DUARTE, J. H. Homogeneous guluronic and mannuronic acid blocks in the alginate of the brown seaweed *Laminaria brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1707–1708, 1991.

DUCATTI, D. R. B. et al. Production of carbohydrate building blocks from red seaweed polysaccharides. Efficient conversion of galactans into C-glycosyl aldehydes. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 576–88, 2009.

DUCATTI, D. R. B. **Hidrólise ácida de galactanas para produção de oligossacarídeos e C-Glicosídeos: Semissíntese de N-alquil e C-Dihidropiridina Glicosídeos**. 192 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

DUCATTI, D. R. B. **Oligossacarídeos obtidos por hidrólise redutiva parcial de polissacarídeos de algas vermelhas: estudos de ressonância magnética nuclear**. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

DUCATTI, D. R. B. et al. Production of agar- and -carra-oligosaccharides by partial acid hydrolysis of galactans. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 296–304, 2011.

- DUCKWORTH, M.; YAPHE, W. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 16, n. 1, p. 189–197, 1971.
- DUNFIELD, L. G.; WHITTINGTON, S. G. Influence of the alternate chair conformation on the unperturbed dimensions of Alginic Acid. **Macromolecules**, v. 7, n. 6, p. 946–948, 1974.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the sulphate ester of sulphated polysaccharide. **Biochemical Journal**, v. 84, p. 106–110, 1962.
- EL HARCHI, M.; FAKIHI KACHKACH, F. Z.; EL MTILI, N. Optimization of thermal acid hydrolysis for bioethanol production from *Ulva rigida* with yeast *Pachysolen tannophilus*. **South African Journal of Botany**, v. 115, p. 161–169, 2018.
- EL KHOURY, D., GOFF, H. D., ANDERSON, G. H. The role of alginates in Regulation of Food Intake and Glycemia: A Gastroenterological Perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 10, p. 1406–1424, 2013.
- ELCHINGER, P.-H. et al. Tosylcellulose synthesis in aqueous medium. **Green Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 3126, 2012.
- ESMAEILI, C.; HENG, L. Y.; LING, T. L. Nile Blue chromoionophore-doped kappa-carrageenan for a novel reflectometric urea biosensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 221, n. 31, p. 969–977, 2015.
- ESTE, M. D.; EGLIN, D.; ALINI, M. A systematic analysis of DMTMM vs EDC / NHS for ligation of amines to Hyaluronan in water. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 239–246, 2014.
- ESTEVEZ, M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A. S. The system of galactans of the red seaweed , *Kappaphycus alvarezii* , with emphasis on its minor constituents. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2575–2592, 2004.
- FALSHAW, R.; FURNEAUX, R. H.; WONG, H. Analysis of pyruvylated beta-carrageenan by 2D NMR spectroscopy and reductive partial hydrolysis. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 13, p. 1403–1414, 2003.
- FERREIRA, L. G. et al. Chemical structure of the complex pyruvylated and sulfated agaran from the red seaweed *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 347, n. 1, p. 83–94, 2012.
- FIGUEIREDO, D. B. **Desenvolvimento de um método por eletroforese capilar para quantificação de oligossacarídeos sulfatados**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- FRANCO, D., GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 203–206, 2008.

FERTAH, M. et al. Extraction and characterization of sodium alginate from *Moroccan Laminaria digitata* brown seaweed. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S3707–S3714, 2017.

GAMINI, A. et al. Hydrogen-bonding and conformation of agarose in methyl sulfoxide and aqueous solutions investigated by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 304, n. 3–4, p. 293–302, 1997.

GARG, H. S. et al. An antiviral sphingosine derivative from the green alga *Ulva Fasciata*. **Tetrahedron Letters**, v. 33, n. 12, p. 1641–1644, 1992.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 1–14, 2006.

GERICKE, M. et al. Semi-synthetic polysaccharide sulfates as anticoagulant coatings for PET - Cellulose Sulfate. **Macromolecular Bioscience**, v. 11, n. 4, p. 549–556, 2011.

GERICKE, M. et al. Studies on the tosylation of cellulose in mixtures of ionic liquids and a co-solvent. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 526–536, 2012.

GERICKE, M.; HEINZE, T. Homogeneous tosylation of agarose as an approach toward novel functional polysaccharide materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 236–245, 2015.

GOH, C. H.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 1–12, 2012.

GOMEZ, C. G. et al. Influence of the extraction-purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 4, p. 365–371, 2009.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Molecular weight distribution of polysaccharides from edible seaweeds by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). **Talanta**, v. 93, p. 153–159, 2012.

GONÇALVES, A. G. et al. ESI-MS differential fragmentation of positional isomers of sulfated oligosaccharides derived from carrageenans and agarans. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 21, n. 8, p. 1404–1416, 2010.

GONÇALVES, A. G. et al. Sulfated and pyruvylated disaccharide alditols obtained from a red seaweed galactan: ESIMS and NMR approaches. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 24, p. 2443–2453, 2002.

GONÇALVES, A. G. et al. Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: Preparation and capillary electrophoresis separation. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 13, p. 2123–2134, 2005.

GONÇALVES, A. G. **Modificacoes quimicas em oligossacarídeos derivados de polissacarídeos de algas marinhas**. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica)

– Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GONSALVES, A. DE A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.

GRANT, G. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **Fers Letters**, v. 32, n.1, p. 195-198, 1973.

GRASDALEN, H. High-field, ^1H -NMR. spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. **Carbohydrate Research**, v. 118, p. 255–260, 1983.

GRANSDALEN, H., LARSEN, B., SMIDSRØD, O. A NMR study of the composition and sequence of uronate residues in alginates. **Carbohydrate Research**, v. 68, n. 1, p. 23-31, 1979.

GRASDALEN, H.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. ^{13}C NMR studies of alginate. **Carbohydrate Research**, v. 56, p. C11–C15, 1977.

GUISELEY, K. B., STANLEY, N. F.; WHITEHOUSE, P. A. **Carrageenan**, in Handbook of Water-Soluble Gums and Resins (ed. R.L. Davidson), McGraw-Hill, New York, 1980

HAMA, Y. et al. Selective hydrolysis of the 3,6-anhydrogalactosidic linkage in red algal galactan: a combination of reductive acid hydrolysis and anhydrous mercaptolysis. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 74, n. 9, p. 1895–1900, 2010.

HARRINGTON, J. C. et al. Segregative interactions and competitive binding of Ca^{2+} in gelling mixtures of whey protein isolate with Na^+ *k*-carrageenan. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 468–489, 2009.

HAUG, A. et al. Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates. **Acta Chemica Scandinavica**, v.16, p. 1908-1918, 1962.

HAUG, A; LARSEN, B., SMIDSRØD, O. Studies on the Sequence of Uronic Residues in Alginic Acid. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 21, p 691-704, 1967a.

HAUG, A; LARSEN, B., SMIDSRØD, O. Alkaline degradation of alginate. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 21, p 2859-2870, 1967b.

HAUG, A; LARSEN, B., SMIDSRØD, O. Uronic Acid Sequence in Alginate From Diefferent Sources. **Carbohydrate Research**, v. 32, p 217-225, 1974.

HAY, I. D. et al. Microbial alginate production, modification and its applications. **Bacterial alginates**, v. 6, p, 637-650, 2013.

HEINZE, T. et al. Nucleophilic displacement reactions on tosyl cellulose by chiral amines. **Polymer Bulletin**, v. 46, n. 1, p. 7–13, 2001.

HEUKO, J. **Síntese e caracterização de derivado amino carboxilado da agarose**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

HEUSER, E.; HEATH, M.; SHOCKLEY, W. H. The rate of esterification of primary and secondary hydroxyls of cellulose with p-toluenesulfonyl (Tosyl) Chloride. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, n. 2, p. 670–674, 1950.

HEYRAUD, A. et al. NMR spectroscopy analysis of oligoguluronates and oligomannuronates prepared by acid or enzymatic hydrolysis of homopolymeric blocks of alginic acid. Application to the determination of the substrate specificity of *Halietis tuberculata* alginate lyase. **Carbohydrate Research**, v. 289, p. 11–23, 1996.

HOARE, D. G.; KOSHLAND, D. E. A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 10, p. 2447–2453, 1967.

HURTADO, A. Q. et al. The seasonality and economic feasibility of cultivating *Kappaphycus alvarezii* in Panagatan Cays, Caluya, Antique, Philippines. **Aquaculture**, v. 199, n. 3–4, p. 295–310, 2001.

IKEDA, A., TAKAMURA, A., ONO, H. Preparation of low-molecular weight alginic acid by acid hydrolysis. **Carbohydrate polymers**, v. 42, p. 421–425, 2000.

INOUE, Y., NAGASAWA, K. On the reaction of *N*-acetylchondrosine, *N*-acetylchondrosine 6-sulfate, chondroitin 6-sulfate, and heparan with 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide. **Carbohydrate Research**, v. 111, p. 113–125, 1982

JEON, C.; PARK, J. Y.; YOO, Y. J. Characteristics of metal removal using carboxylated alginic acid. **Water Research**, v. 36, n. 7, p. 1814–1824, 2002.

JOUANNEAU, D. et al. Complete assignment of (1)H and (13)C NMR spectra of standard neo-*iota*-carrabiose oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 4, p. 547–51, 2010.

KAVOOSI, G. et al. Microencapsulation of zataria essential oil in agar, alginate and carrageenan. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 45, p. 418–425, 2018.

KAYGUSUZ, h. ET AL. Antimicrobial cerium ion-chitosan crosslinked alginate biopolymerfilms: A novel and potential wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 1161–1165, 2017.

KIM, J. H. et al. Alginate/bacterial cellulose nanocomposite beads prepared using *gluconacetobacter xylinus* and their application in lipase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 137–145, 2017.

KRAAN, P.M.; BUMA, P.; KUPPEVELT, T.; BERG, W.B. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.10, p.613–37, 2002.

KNUTSEN, S. H. et al. A Modified System of Nomenclature for Red Algal Galactans. **Botanica Marina**, v. 37, n. 2, p. 163–170, 1994.

KNUTSEN, S. H. et al. ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans : application in research and industry. **Trends in Food Technology**, v. 13, p. 73–92, 2002.

KHORANA, H. G. The chemistry of Carbodiimides. **British Columbia Research Council, Vancouver 8, British Columbia**, Canada, 1953.

KOHYAMA, K.; SANO, Y.; NISHINARI, K. A mixed system composed of different molecular weights konjac glucomannan and κ -carrageenan. II. Molecular weight dependence of viscoelasticity and thermal properties. **Food Hydrocolloids**, v. 10, n. 2, p. 229–238, 1996.

KOLENDER, A. A.; MATULEWICZ, M. C. Desulfation of sulfated galactans with chlorotrimethylsilane. Characterization of β -carrageenan by ^1H NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 9, p. 1619–1629, 2004.

KONDAVEETI, S.; PRASAD, K.; SIDDHANTA, A. K. Functional modification of agarose : A facile synthesis of a fluorescent agarose-tryptophan based hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 1, p. 165–171, 2013.

KRAUS, G. A.; LIU, P. A direct route to the pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine ring system using aryl triflates. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 42, p. 7595–7598, 1995.

KUNIOKA, M.; FURUSAWA, K. Poly (g-glutamic acid) Hydrogel Prepared from Microbial Poly (g -glutamic acid) and Alkanediamine with water-soluble carbodiimide. **Journal of Applied Polymers science**, p. 1889–1896, 1997.

LAHAYE, M.; AXELOS, M. A. V. Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva spp*). **Carbohydrate Polymers**, v. 22, p. 261–265, 1993.

LAHAYE, M. NMR spectroscopic characterisation of oligosaccharides from two *Ulva rigida* ulvan samples (Ulvales, Chlorophyta) degraded by a lyase. **Carbohydrate Research**, v. 314, n. 1–2, p. 1–12, 1998.

LAHAYE, M. et al. Chemical composition and ^{13}C NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 1999.

LAHAYE, M.; BRUNEL, M.; BONNIN, E. Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva sp.* (Ulvales, Chlorophyta). **Carbohydrate Research**, v. 304, n. 3–4, p. 325–333, 1997.

LAHAYE, M.; INIZAN, F.; VIGOUREUX, J. NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 2–3, p. 239–249, 1998.

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and function properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1765–1774, 2007.

- LEAL, D. et al. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 308–316, 2008.
- LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.
- LI, L. et al. Carrageenan and its applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n. 1, p. 1–11, 2014.
- LI, Q. et al. The heparin-like activities of negatively charged derivatives of low-molecular-weight polymannuronate and polyguluronate. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 313–320, 2017.
- LIANG, W. et al. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 776–785, 2014.
- LIAO, M. L. et al. Sulfated galactans from Australian specimens of the red alga *Phacelocarpus peperocarpus* (Gigartinales, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 296, p. 237–247, 1996.
- LIU, X. et al. Immunomodulatory effects of an acetylated *Cyclocarya paliurus* polysaccharide on murine macrophages RAW264.7. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 576–581, 2017a.
- LIU, Z. et al. Extraction, isolation and characterization of nanocrystalline cellulose from industrial kelp (*Laminaria japonica*) waste. **Carbohydrate Polymers**, v. 173, p. 353–359, 2017b.
- MARINS, B. V et al. Taxonomy of the southwestern Atlantic endemic kelp : *Laminaria abyssalis* and *Laminaria brasiliensis* (Phaeophyceae , Laminariales) are not different species. v. 60, p. 51–60, 2012.
- MAROUNEK, M. et al., Comparative study of the hypocholesterolemic and hypolipidemic activity of alginate and amidated alginate in rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 620–024, 2017.
- MATSUHIRO, B. et al. Sulfation of agarose from subantarctic *Ahnfeltia plicata* (Ahnfeltiales, Rhodophyta): Studies of its antioxidant and anticoagulant properties in vitro and its copolymerization with acrylamide. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 5, p. 2011–2019, 2014.
- MATSUHIRO, B.; VA, A. E.; CHANDÕ, N. P. Alginic acids in *Lessonia trabeculata* : characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 81–87, 2001.
- MESTECHKINA, N. M.; SHCHERBUKHIN, V. D. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 267–273, 2010.
- MILLANE, R. P. et al. The molecular structure of kappa-carrageenan and comparison with iota-carrageenan. **Carbohydrate Research**. v. 182, n. 1, p. 1–17, 1988.

- MILLER, I. J. Alginate composition of some New Zealand brown seaweeds. **Phytochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1315–1317, 1996.
- MORRIS, E. R.; REES, D. A.; ROBINSON, G. Cation-specific aggregation of carrageenan helices: Domain model of polymer gel structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 138, n. 2, p. 349–362, 1980.
- MYSLABODSKI, D. E.; STANCIOFF, D.; HECKERT, R. A. Effect of acid hydrolysis on the molecular weight of kappa carrageenan by GPC-LS. **Carbohydrate Polymers**, v. 31, p. 83–92, 1996.
- NAGASAWA, K. et al. Sulfation of dextran with piperidine-N-sulfonic acid. **Carbohydrate Research**, v. 21, n. 3, p. 420–426, 1972.
- NAI-YU, Z. et al. Effects of composition and structure of alginates on adsorption of divalent metals. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 12, n. 1, p. 78–83, 1994.
- NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. **Bioconjugate Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 123–130, 1995.
- NAKAMURA, K. et al. Thermal properties of water insoluble alginate films containing di- and trivalent cations. **Thermochimica Acta**, v. 267, p. 343–353, 1995.
- NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 4, p. 187–205, 2013.
- NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S. Alkali modification of carrageenans - II . The cyclization of model compounds containing non-sulfated β -D-galactose units. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 97–99, 1995.
- NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S. Room temperature , low-field ^{13}C -NMR, spectra of degraded carrageenans : Part III . Autohydrolysis of a *lambda* carrageenan and of its alkali-treated derivative. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, n. 3, p. 177–181, 1993.
- Onsoyen, E. Commercial applications of alginates. **Carbohydrates in Europe**, v. 14, p. 26–31, 1996.
- OOI, L.; HENG, L. Y.; MORI, I. C. A high-throughput oxidative stress biosensor based on *Escherichia coli* rOGFP2 cells immobilized in a *k*-Carrageenan matrix. **Sensors (Switzerland)**, v. 15, n. 2, p. 2354–2368, 2015.
- ORSATO, A. **Síntese de alquilaminoglicosídeos sulfatados para o desenvolvimento de compostos com atividade antiviral**. 135 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- ORTIZ, J. et al. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweed *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. **Food Chemistry**, v. 99, p. 98–104, 2006.

- OZA, M. D. et al. Functional modification of agarose: A facile synthesis of a fluorescent agarose – guanine derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 4, p. 878–884, 2010.
- PAPAGEORGIOU, S. K.; KOUVELOU, E. P.; KATSAROS, F. K. Calcium alginate beads from *Laminaria digitata* for the removal of Cu^{+2} and Cd^{+2} from dilute aqueous metal solutions. **Desalination**, v. 224, n. 1–3, p. 293–306, 2008.
- PAPY-GARCIA, D. et al. Nondegradative sulfation of polysaccharides synthesis and structure characterization of biologically active heparan sulfate mimetics. **Macromolecules**, p. 4647–4654, 2005.
- PARK, H. et al. Alginate hydrogels modified with low molecular weight hyaluronate for cartilage regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 162, p. 100–107, 2017.
- PAULA, E. J. et al. Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of São Paulo State, Brazil. **Phycological Research**, v. 50, p. 1–9, 2002.
- PEI, M. et al. Alginate-based cancer-associated, stimuli-driven and turn-on theranostic prodrug nanogel for cancer detection and treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 183, p. 131–139, 2018.
- PENG, L. Q. et al. Pyridinium ionic liquid-based liquid-solid extraction of inorganic and organic iodine from *Laminaria*. **Food Chemistry**, v. 239, p. 1075–1084, 2018.
- PENMAN, A.; SANDERSON, G. R. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. **Carbohydrate Research**, v. 25, n. 2, p. 273–282, 1972.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. Londres: Academic Press, 1967.
- PÉREZ, R.; KAAS, R. Culture expérimentale de l'algue *Undaria pinnatifida* sur les côtes de France. **Science et Pêche**, v. 343, p. 1–15, 1984.
- PETEIRO, C. Alginates and their Biomedical Applications. **Springer Singapore**. cap. 2, p. 28–66, 2018.
- PETEIRO, C.; SÁNCHEZ, N.; MARTÍNEZ, B. Mariculture of the Asian kelp *Undaria pinnatifida* and the native kelp *Saccharina latissima* along the Atlantic coast of Southern Europe: An overview. **Algal**, v. 15, p. 9–23, 2016.
- PETIT, E. et al. Controlled sulfatation of natural anionic bacterial polysaccharides can yield agents with specific regenerating activity *in vivo*. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 445–452, 2004.
- PINKERT, A. et al. Ionic Liquids and Their Interaction with Cellulose. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 6712–6728, 2009.
- POLYAK, B.; SHIMONA, G.; MARKS, R. S., Synthesis and Characterization of a Biotin-Alginate Conjugate and its Application in a Biosensor Construction. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 389–396, 2004.

- POPA, E. G. et al. Chondrogenic potential of injectable *k*-carrageenan hydrogel with encapsulated adipose stem cells for cartilage tissue-engineering applications. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 5, p. 550-63, 2015.
- PORSE, H.; RUDOLPH, B. The seaweed hydrocolloid industry: 2016 updates, requirements, and outlook. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 5, p. 2187–2200, 2017.
- POUYANI, T.; PRESTWICH, G. D. Functionalized derivatives of hyaluronic acid oligosaccharides: drug carriers and novel biomaterials. **Bioconjugate Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 339–347, 1994.
- PRADO-FERNÁNDEZ, J. et al. Quantitation of *k*-, *i*- and *λ*-carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, p. 23–37, 2003.
- QUANCIA, L. et al. Preparation, characterization and antioxidant activities of polymannuronic acid phosphate, H-phosphonate and sulfate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 281-286, 2013.
- QIN, Z. et al. Synthesis and characterization of bacterial cellulose sulfates using a SO₃/pyridine complex in DMAc/LiCl. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 947–953, 2014.
- RAMOS, P. E. et al. Food Hydrocolloids Effect of alginate molecular weight and M / G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 8-16, 2017.
- REES, D. A. a Note on the characterization of carbohydrate sulphates by acid hydrolysis. **The Biochemical journal**, v. 88, p. 343–5, 1963.
- RINCONES, R. E., RUBIO, J. N. Introduction and commercial cultivation of the red alga *Eucheuma* in Venezuela for the production of phycocolloids. **World Aquaculture**, v. 30, p. 57-61, 1990.
- ROBIC, A. et al. Determination of the chemical composition of ulvan, a cell wall polysaccharide from *Ulva spp.* (Ulvales, Chlorophyta) by FT-IR and chemometrics. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 4, p. 451–456, 2009.
- ROCHA, P. M. et al. Encapsulation of adipose-derived stem cells and transforming growth factor-β1 in carrageenan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 26, n. 5, p. 493–507, 2011.
- RONGHUA, H.; YUMIN, D.; JIANHONG, Y. Preparation and anticoagulant activity of carboxybutyrylated hydroxyethyl chitosan sulfates. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 4, p. 431–438, 2003.
- ROWLEY, J. A.; MOONEY, D. J. Alginate type and RGD density control myoblast phenotype. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 60, n. 2, p. 217–223, 2002.
- RUNNING, C. A.; FALSHAW, R.; JANASWAMY, S. Trivalent iron induced gelation in *λ*-carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 4, p. 2735–2739, 2012.

SAHA, D.; BHATTACHARYA, S. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 6, p. 587–597, 2010.

SANTOS, G. A. Carrageenans of species of *Eucheuma* J. Agardh and *Kappaphycus* Doty (Solieriaceae, Rhodophyta). **Aquatic Botany**, v. 36, n. 1, p. 55–67, 1989.

SCHANTÉ, C. E. et al. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 469–489, 2011.

SCHIENER, P. et al. The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 363–373, 2015.

SCHMIDT, S.; LIEBERT, T.; HEINZE, T. Synthesis of soluble cellulose tosylates in an eco-friendly medium. **Green Chemical**, v. 16, n. 4, p. 1941–1946, 2014.

SEKRAL, M.; LEGRAND, P. A spectroscopic investigation of the carrageenans and agar in the 1500–100 cm⁻¹ spectral range. **Spectrochimica Acta**, v. 49, n. 2, p. 209–221, 1993.

S.F-TISCHER, P.C.; TALARICO, L. B.; NOSEDA, M. D.; GUIMARÃES, S. M. P. B.; DAMONTE, E. B.; DUARTE, M. E. R. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. **Carbohydrate Polymers**, v.63, n.4, p. 459–465, 2006.

SHAHIDI, F. Nutraceuticals and Functional foods: whole versus processed foods. **Trend in Food Science & Technology**, London, v. 20, n. 9, p. 276–387, 2009.

SHAO, P. et al. Effects of partial desulfation on antioxidant and inhibition of DLD cancer cell of *Ulva fasciata* polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 307–313, 2014.

SHAO, P. et al. Chemical Stability and in vitro release properties of β-carotene in emulsions stabilized by *Ulva fasciata* polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 225–231, 2017.

SHEN, J. et al. Expression and characterization of a *k*-carrageenase from marine bacterium *Wenyngzhuangia aestuarii* OF219: A biotechnological tool for the depolymerization of *k*-carrageenan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 93–100, 2018.

GOVINDAN, S.M.; THOMAS, J.; KURUP, M. G. In vitro antioxidant and antitumor activity of polysaccharide isolated from *Ulva fasciata*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3, n. 3, p. 238–246, 2012.

SIDDHANTA, A. K. et al. Functional modification mediated value addition of seaweed polysaccharides – a perspective. **RSC Advances**, v. 5, n. 73, p. 59226–59239, 2015.

SINGH, S. K., JACOBSON, S.P. Kinetics of acid hydrolysis of κ -carrageenan as determined by molecular weight (SECMALLSRI), Gel Breaking Strength, and Viscosity Measurements. **Carbohydrate Polymers**, v. 23: p 89-103, 1994.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C.; Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7th ed., John Wiley & Sons: New York, 2005.

SOUZA et al. In vitro activities of *kappa*-carrageenan isolated from red marine alga *Hypnea musciformis*: Antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 112, p. 1248 - 1256. 2018.

SPICHTIG, V.; AUSTIN, S. Determination of the low molecular weight fraction of food-grade carrageenans. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 861, p. 81–87, 2008.

STAGNARO, P. et al. Alginate-polymethacrylate hybrid hydrogels for potential osteochondral tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 185, p. 56–62, 2018.

STENECK, R.; ERLANDSON, J. M. Kelp Forest Ecosystems : Biodiversity , Stability , Resilience and Future. **Environmental Conservation**, v. 29, n. 4, p. 436–459, 2002.

STEVENSON, T.T.; FURNEAUX, R.H. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carbohydrate Research**., v. 210, p. 277-298, 1991.

STORTZ, C. A.; CASES, M. R.; CEREZO, A. S. The system of agaroids and carrageenans from the soluble fraction of the tetrasporic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa*. **Carbohydrate Polymers**. v. 34, p. 61–65, 1997.

STORTZ, C. A.; CEREZO, A. S. Room temperature, low-field ¹³C-NMR spectra of degraded kappa iota carrageenans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, p. 101–104, 1991.

STORTZ, C. A.; CEREZO, A. S. The ¹³C NMR spectroscopy of carrageenans : calculation of chemical shifts and computer-aided structural determination. v. 18, p. 237–242, 1992.

SU, Y. et al. Modification of agarose with carboxylation and grafting dopamine for promotion of its cell-adhesiveness. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 2245–2251, 2013.

SUN, Y. et al. Impact of acidic, water and alkaline extraction on structural features, antioxidant activities of *Laminaria japonica* polysaccharides. **International journal of Biological Macromolecules**. v. 112, p. 985-995, 2018.

SWAISGOOD, H.; NATAKE, M. Effect of carboxyl group modification on some of the enzymatic properties of L-glutamate dehydrogenase. **Journal of Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 77–86, 1973.

TABARSA, M. et al. Water-soluble polysaccharides from *Ulva intestinalis*: Molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 2, p. 599–608, 2018.

TAKO, M.; YOZA, E.; TOHMA, S. Chemical characterization of acetyl fucoidan and alginate from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus*. **Botanica Marina**, v. 43, n. 4, p. 393–399, 2000.

TAUBNER, T.; MAROUNEK, M.; SYNITSYA, A. Preparation and characterization of amidated derivatives of alginic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 202–207, 2017.

TAVASSOLI-KAFRANI, E.; SHEKARCHIZADEH, H.; MASOUDPOUR-BEHABADI, M. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 360–374, 2016.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuranans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383–1388, 1972.

THANH, T. T. T. et al. Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 695–702, 2016.

THÀNH, T. T. T. et al. Molecular characteristics and gelling properties of carrageenan family 2. Tri-sulfated and tetra-sulfated carrageenans. **Polymer Bulletin**, v. 47, n. 3–4, p. 305–312, 2001.

TU, C. et al. Biomaterials Receptor-targeted iron oxide nanoparticles for molecular MR imaging of in flamed atherosclerotic plaques. **Biomaterials**, v. 32, n. 29, p. 7209–7216, 2011.

TUL'CHINSKY, V. et al. Study of the infrared spectra of oligosaccharides in the region 1000–40 cm⁻¹. **Carbohydrate Research**, v. 51, p. 1–8, 1976.

TYMON, T. M. et al. Some aspects of the iodine metabolism of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* (phaeophyceae). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 177, p. 82–88, 2017.

UENO, M. et al. Comparative study on antioxidative and macrophage-stimulating activities of polygluronic acid (PG) and polymannuronic acid (PM) prepared from alginate. **Carbohydrate Research**, v. 352, p. 88–93, 2012.

USOV, A. I. NMR Spectroscopy of Red Seaweed Polysaccharides: Agars, Carrageenans, and Xylans. **Botanica Marina**, v. 27, n. 5, p. 189–202, 1984.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**, v. 12, n. 3, p. 301–308, 1998.

USOV, A. I., ELASHVILI, M. Y. Polysaccharides of algae: investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae), using partial reductive hydrolysis. **Botanica Marina**, v. 34, p. 553–560, 1991.

VAN DE VELDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H. S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 13, p. 2309–2313, 2004.

VAN de VELDE, F. et al. ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 73-92, 2002.

VAN DE VELDE, F., ROLLEMA, H. S. High resolution NMR of carrageenans. **Modern Magnetic Resonance**, p. 1605–1610, 2008.

VENKATESAN, J. et al. Antimicrobial and anticancer activities of porous chitosan-alginate biosynthesized silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 515-525, 2017.

VERMA, M., GU, F. X. Microwave-enhanced reductive amination via Schiff's base formation for block copolymer synthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 4, p. 2740-2744, 2012.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. D. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139–145, 2004.

VUONG, D. et al. Fitoterapia A study of the chemical diversity of macroalgae from South Eastern Australia. **Fitoterapia**, v. 126, p. 53–164, 2018.

WANG, W. et al. In vitro inhibitory effect of carrageenan oligosaccharide on influenza A H1N1 virus. **Antiviral Research**, v. 92, n. 2, p. 237–246, 2011.

WANG, Z. et al. Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 74, n. 235, p. 147–157, 2018.

WESTERMEIER, R. et al. Variations of chemical composition and energy content in natural and genetically defined cultivars of *Macrocystis* from Chile. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, p. 1191-1201, 2012.

WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W. Sulfation. **Methods Carbohydrate Chemistry**, v. 4, p. 297-298, 1964.

XU, F. et al. Optimization, characterization, sulfation and antitumor activity of neutral polysaccharides from the fruit of *Borojoa sorbilis* cuter. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 364–372, 2016.

YU, G. et al. Structural studies on kappa-carrageenan derived oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 5, p. 433–440, 2002.

YUAN, H. et al. Preparation and in vitro antioxidant activity of *k*-carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 4, p. 685–692, 2005.

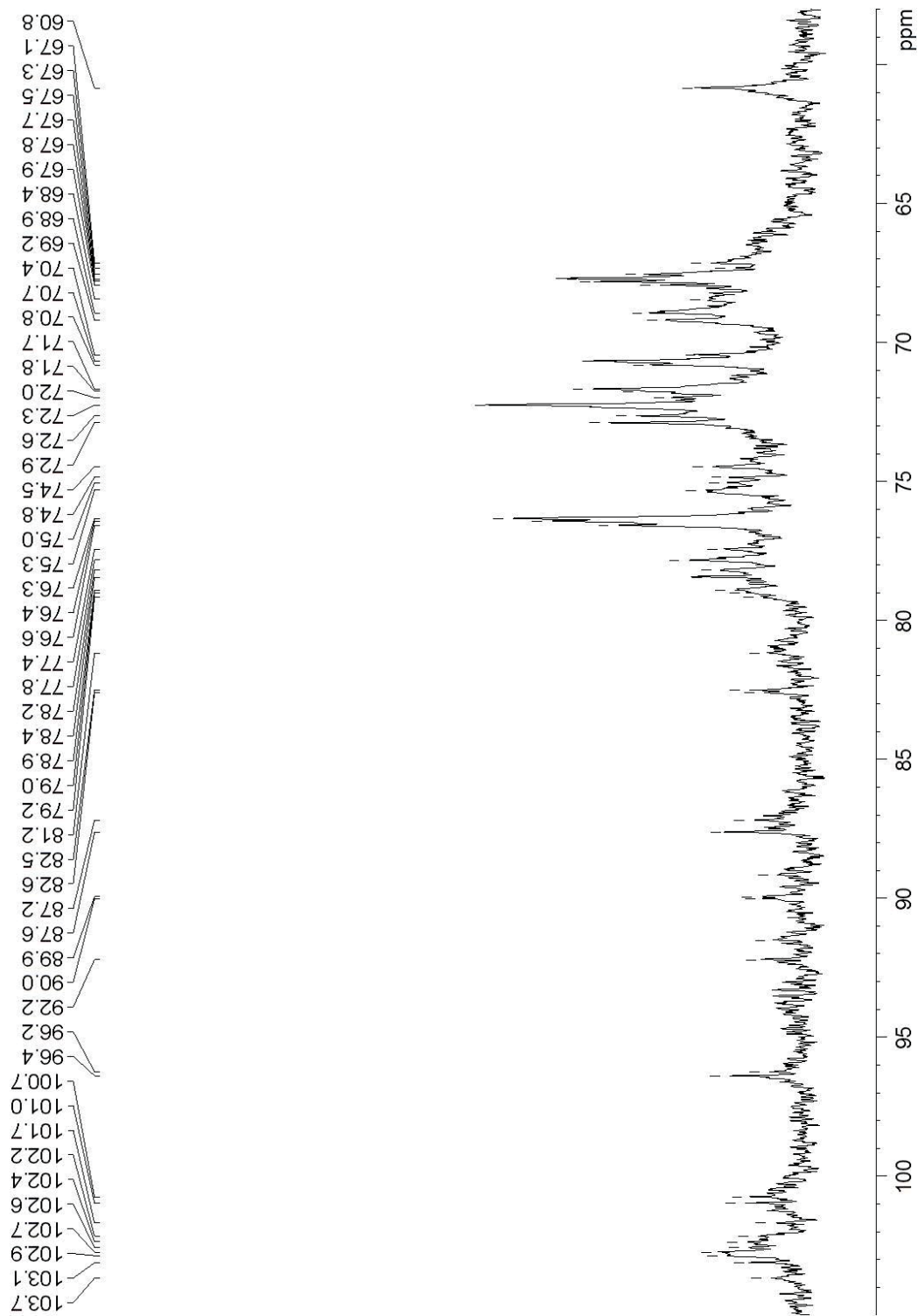
ZAKRZEWSKA, M. E.; BOGEL-YUKASIK, E.; BOGEL-YUKASIK, R. Solubility of carbohydrates in ionic liquids. **Energy and Fuels**, v. 24, n. 2, p. 737–745, 2010.

ZAMPANO, G.; BERTOLDO, M.; CIARDELLI, F. Defined chitosan-based networks by C-6-azide-alkyne “click” reaction. **Reactive and Functional Polymers**, v. 70, n. 5, p. 272–281, 2010.

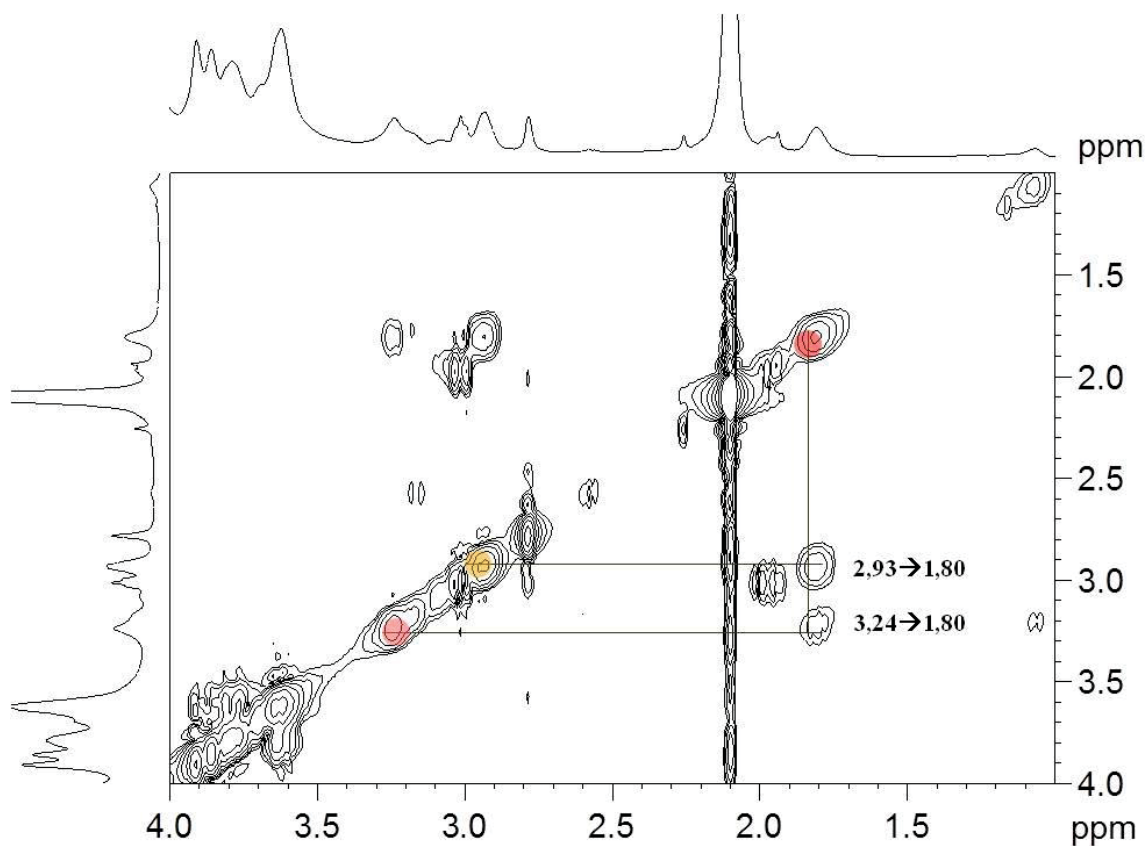
ZHANG, Z. et al. Preparation and structure elucidation of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Vibrio sp.* 510. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 8, p. 1475–1481, 2004.

ZHOU, G. et al. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight λ -carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 1, p. 47–53, 2004.

ANEXOS

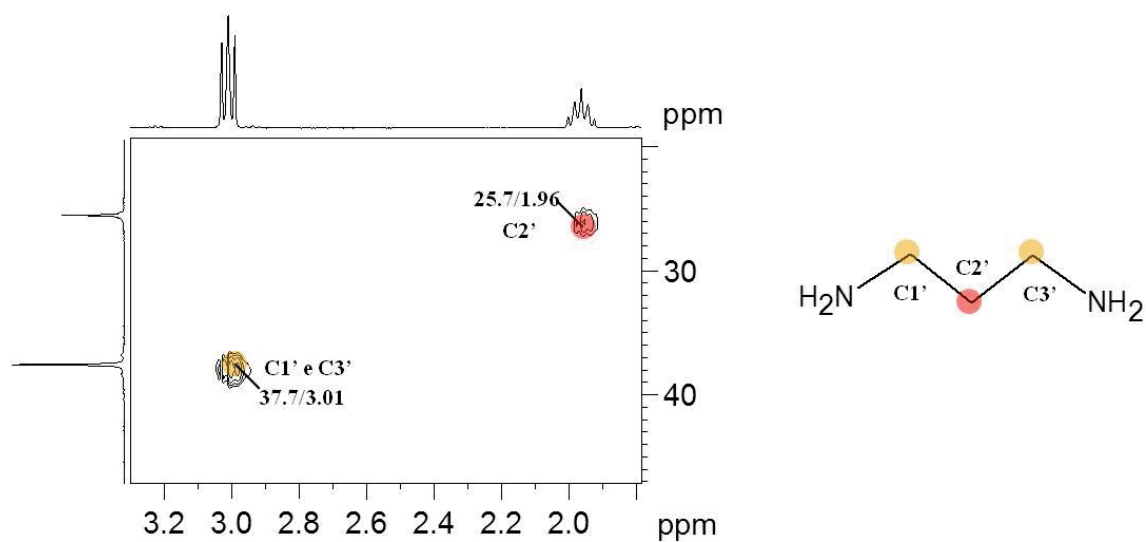
ANEXO 1 – ESPECTRO DE ^{13}C DA FRAÇÃO KD-OS

ANEXO 2 – ESPECTRO DE RMN DE COSY DA FRAÇÃO ALG-DAP

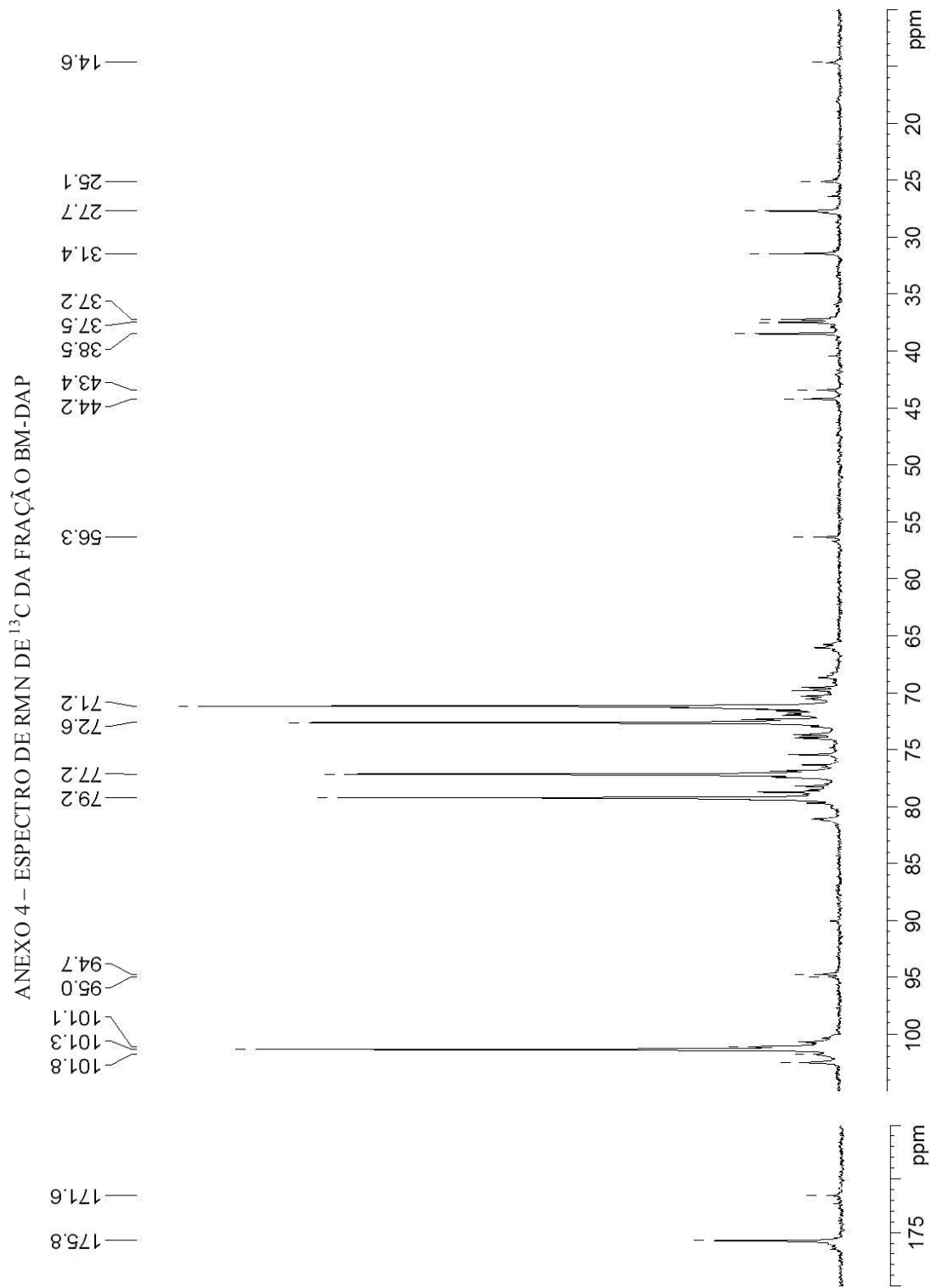


Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (2,10). FONTE: O autor (2018).

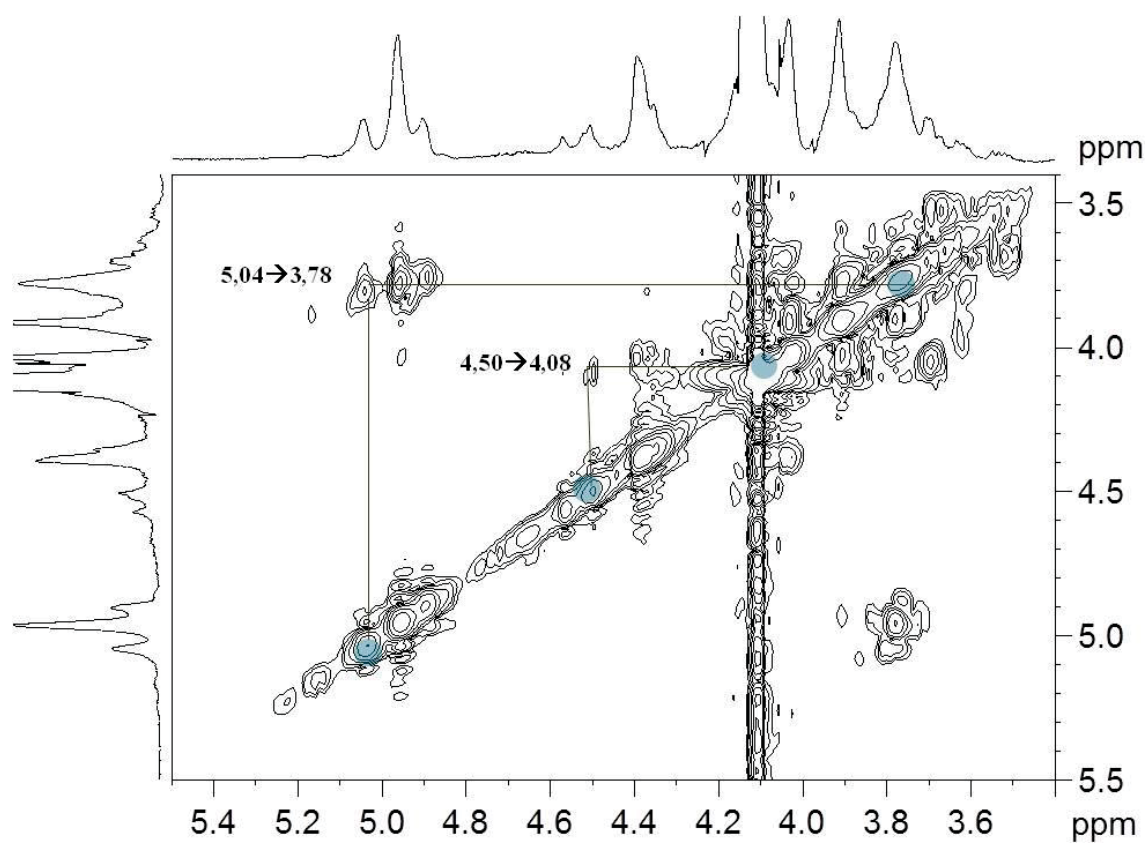
ANEXO 3 – ESPECTRO DE RMN DE HSQC DA DAP



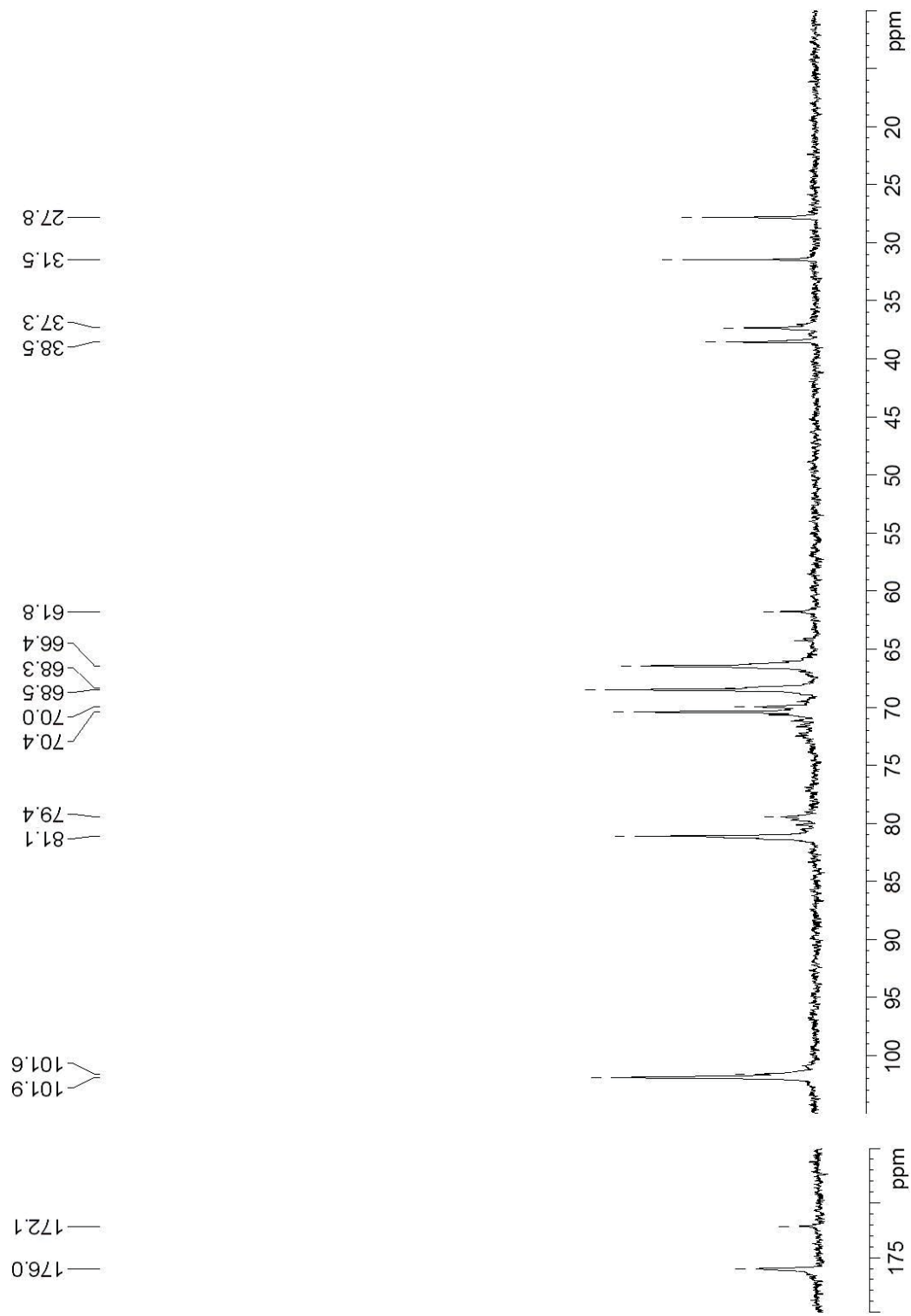
Solvente: D₂O, 70 °C, pH 7; acetona como padrão interno (31,45), pH 7. FONTE: O autor (2018)



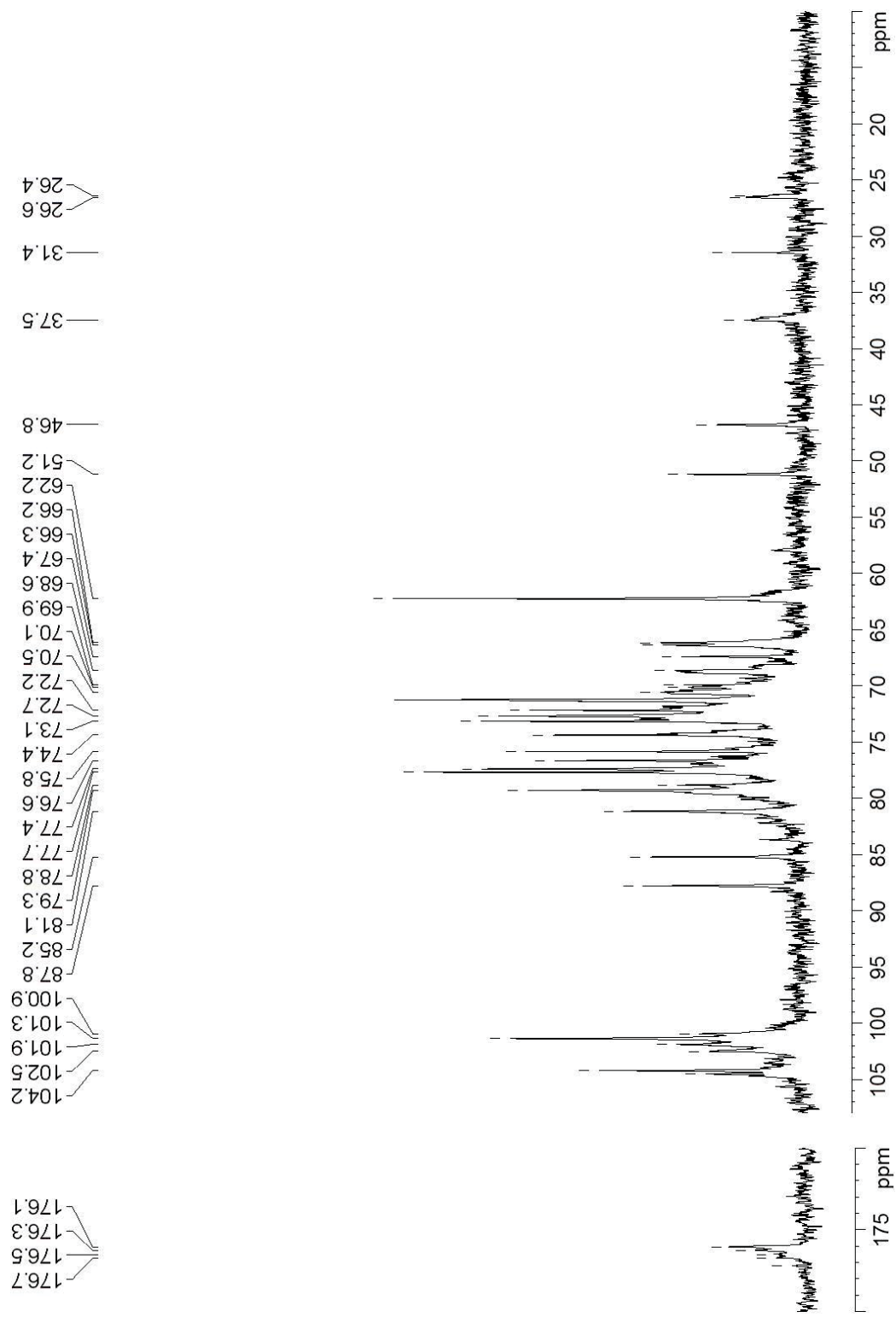
ANEXO 5 – ESPECTRO DE RMN DE COSY DA FRAÇÃO BG-DAP



Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (2,10). FONTE: O autor (2018).

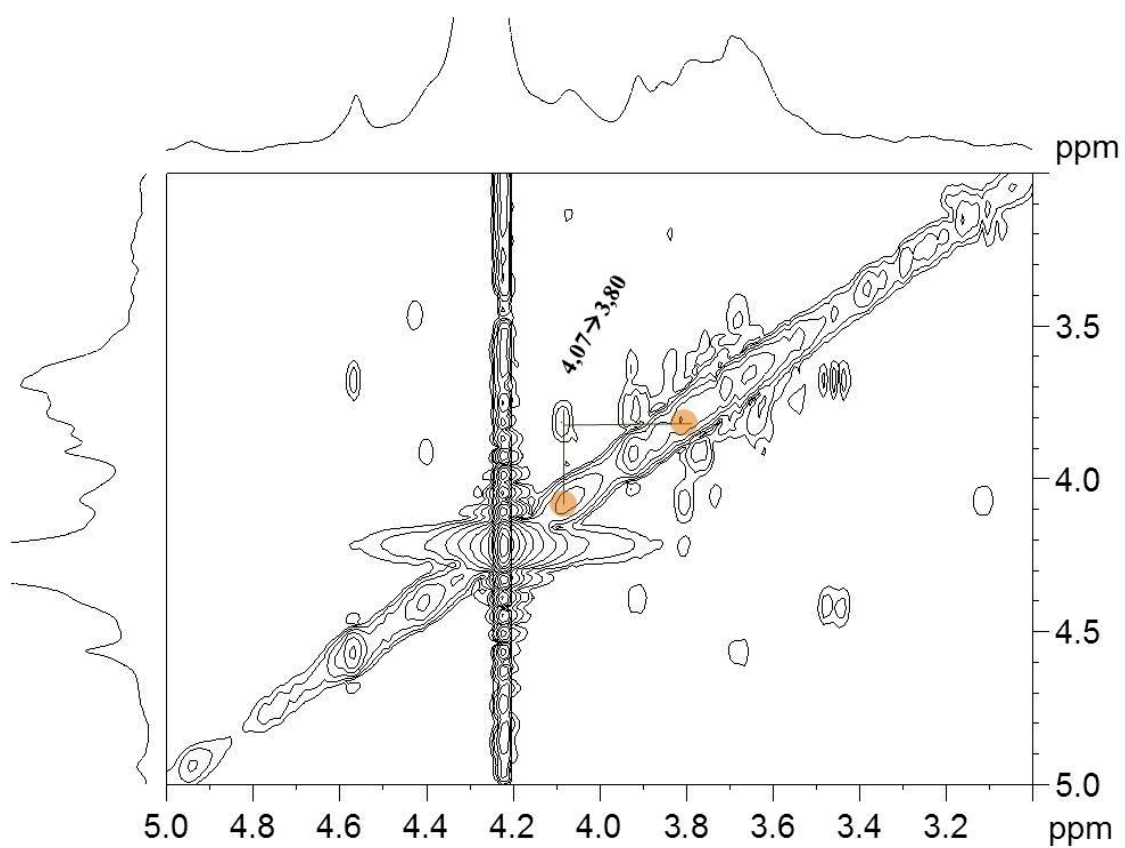
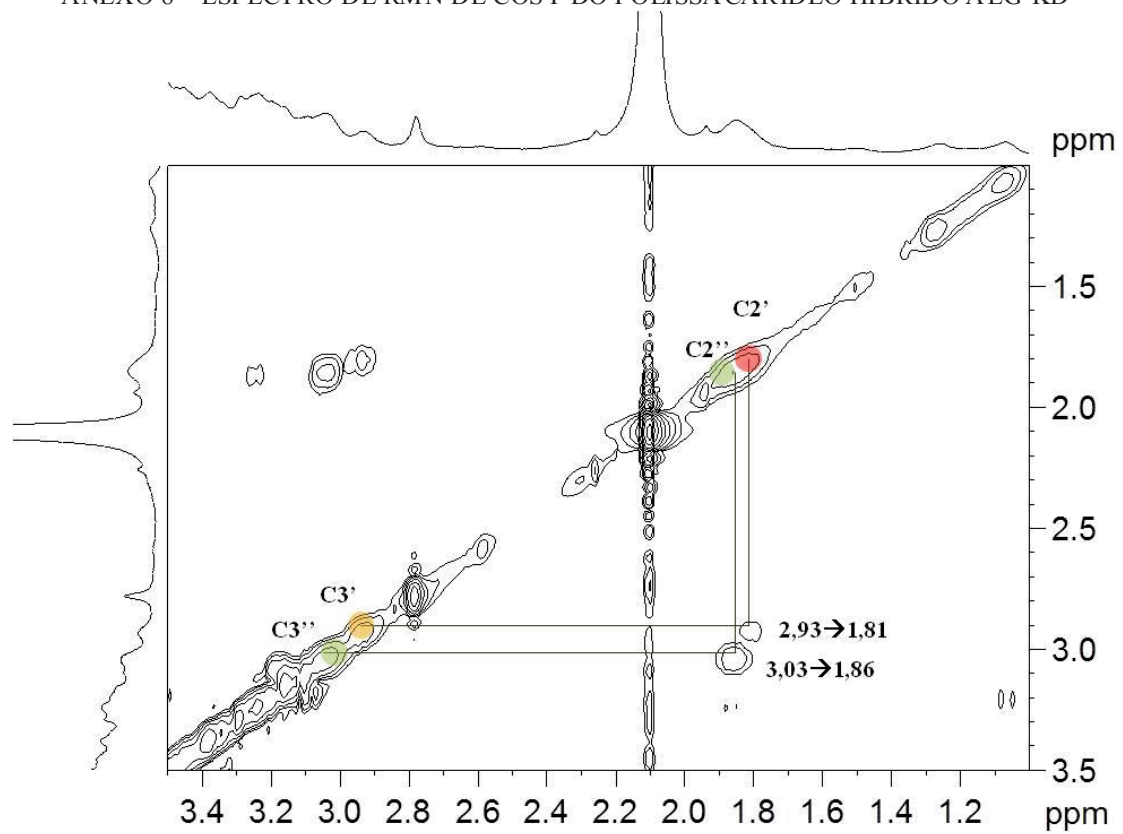
ANEXO 6 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO BG-DAP

Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (31,45). FONTE: O autor (2018).

ANEXO 7 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD

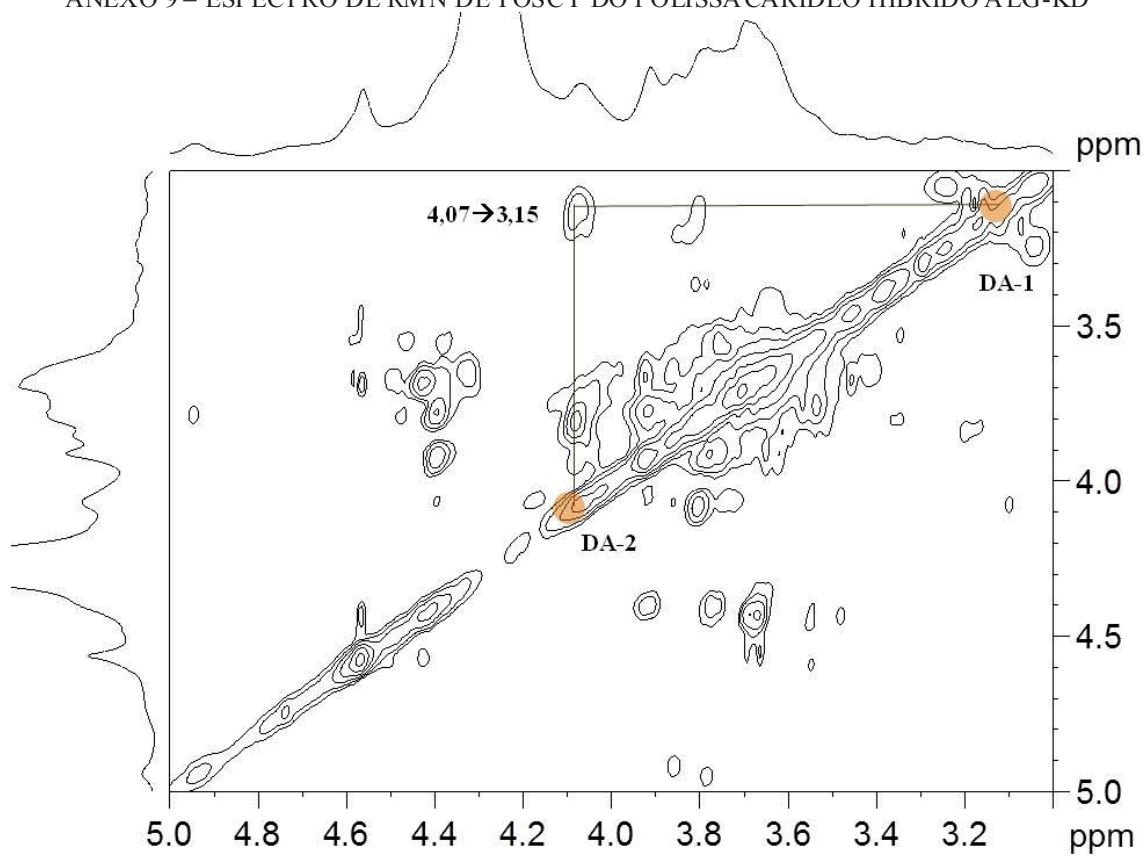
Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (31,45). FONTE: O autor (2018).

ANEXO 8 – ESPECTRO DE RMN DE COSY DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD

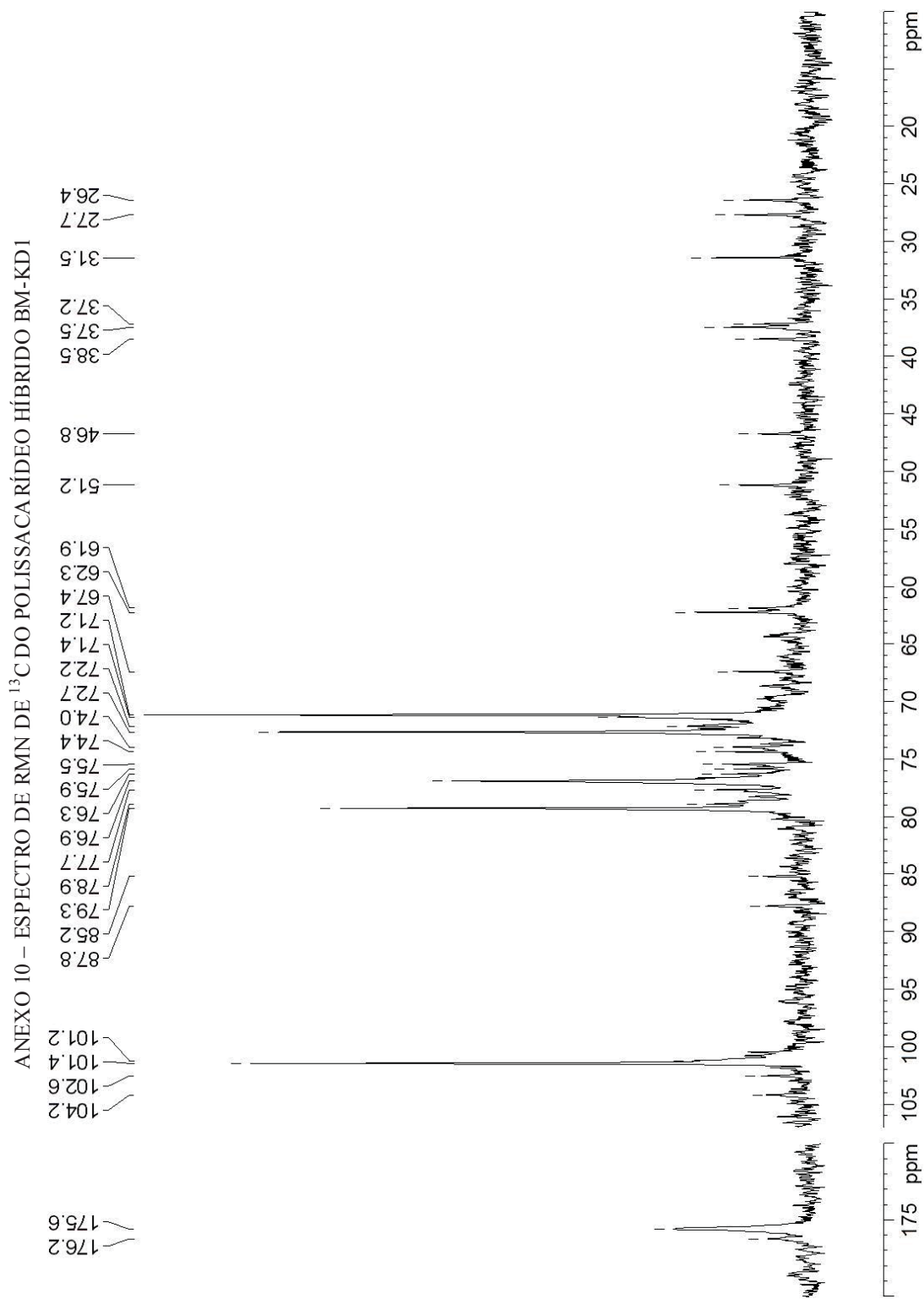


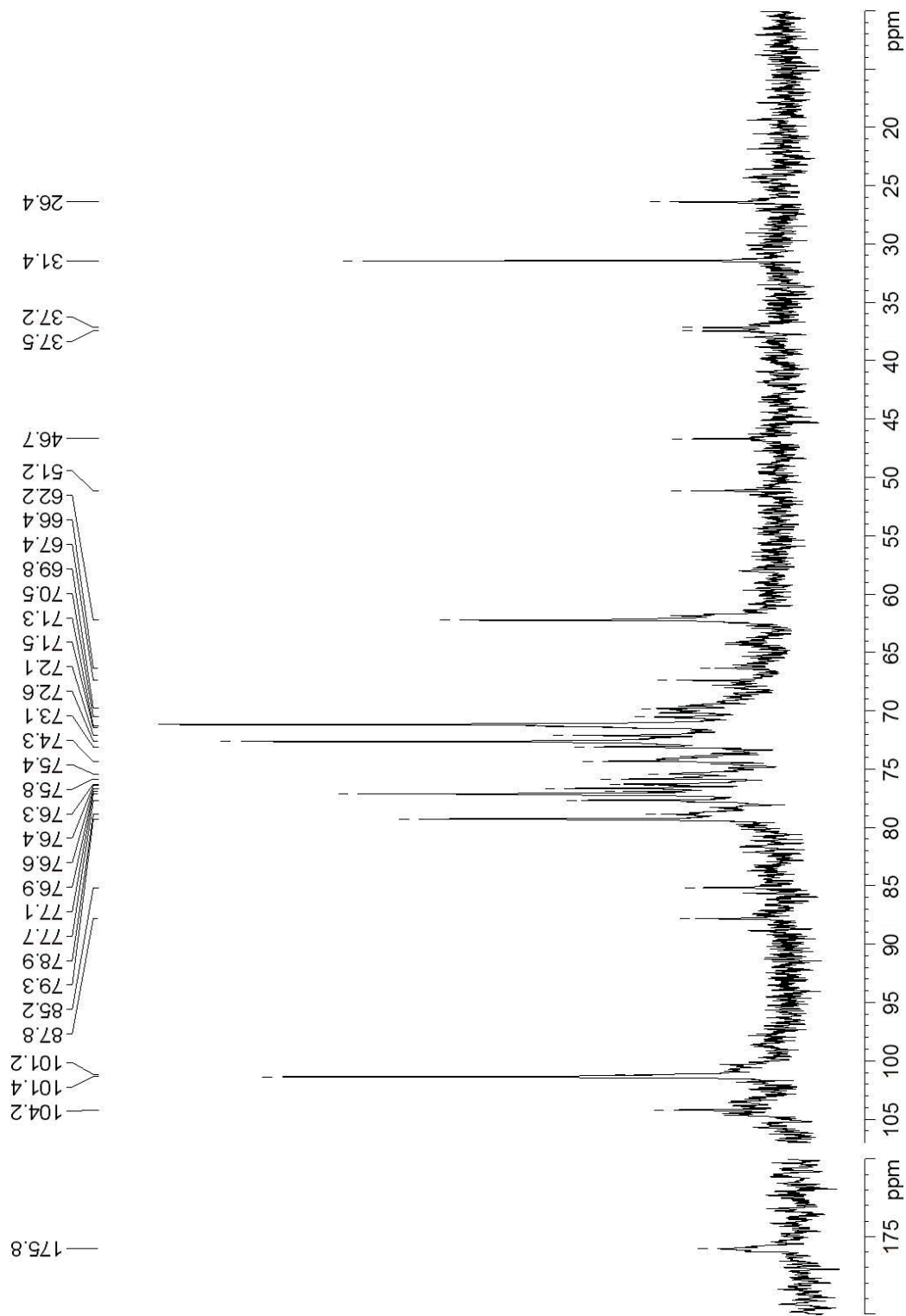
Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (2,10). FONTE: O autor (2018).

ANEXO 9 – ESPECTRO DE RMN DE TOSCY DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO ALG-KD



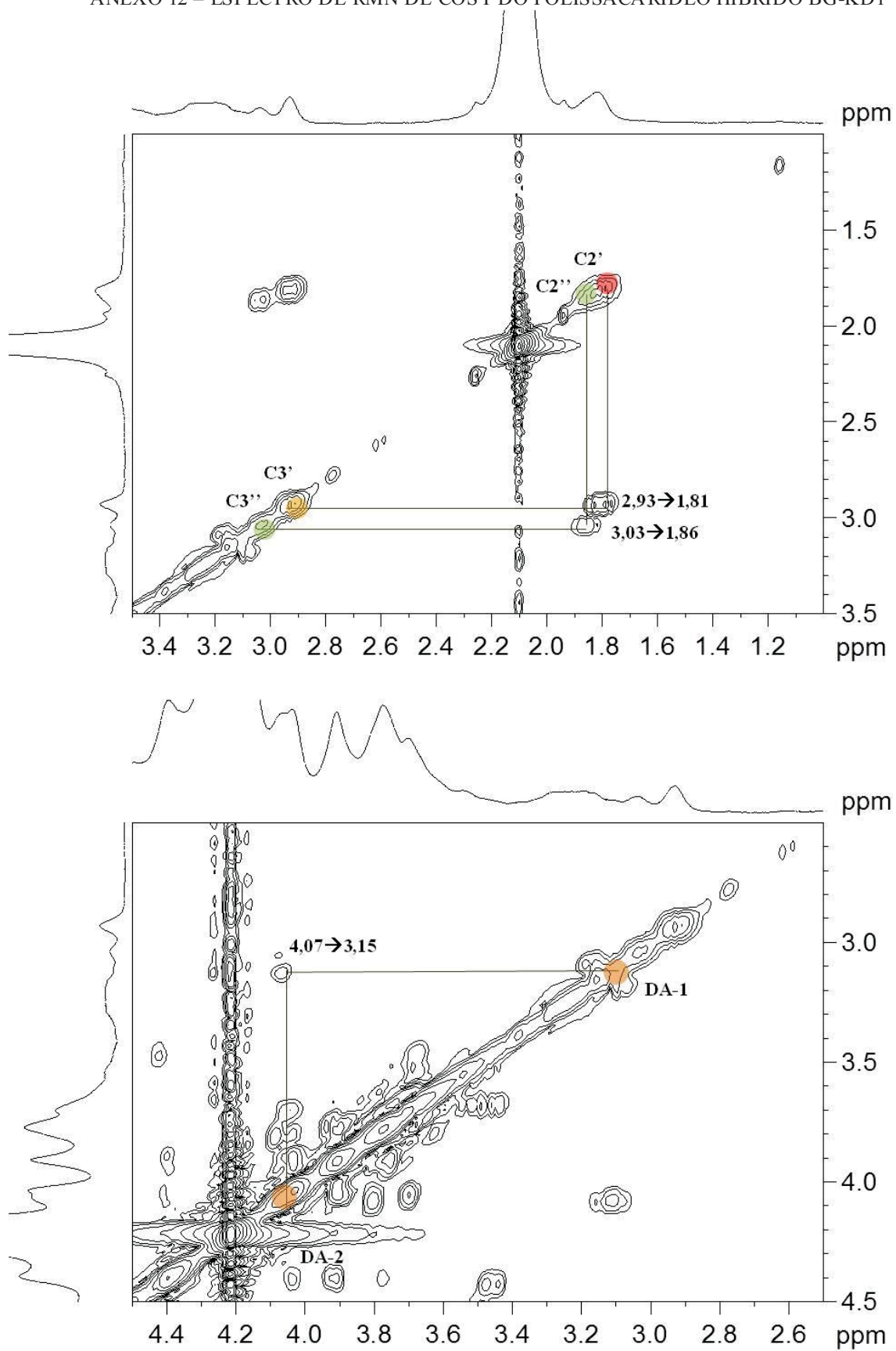
Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (2,10). FONTE: O autor (2018).

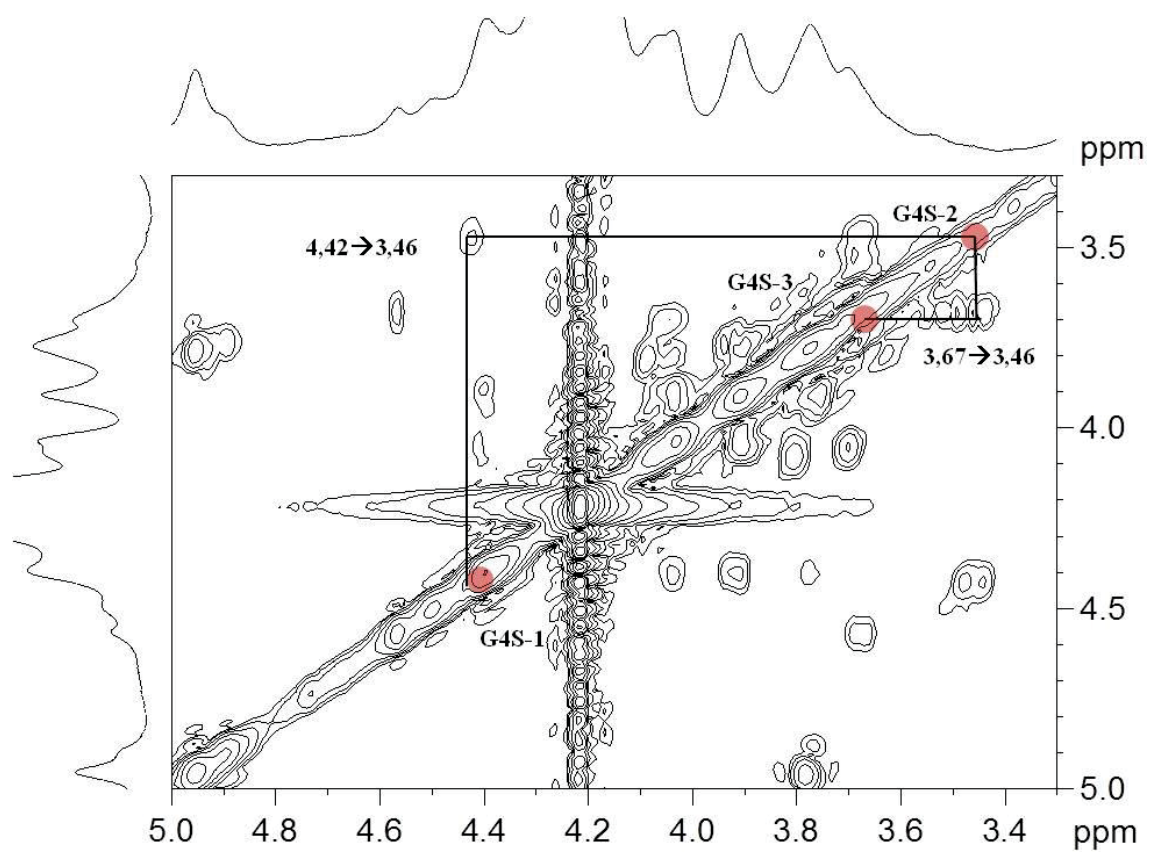


ANEXO 11 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BM-KD2

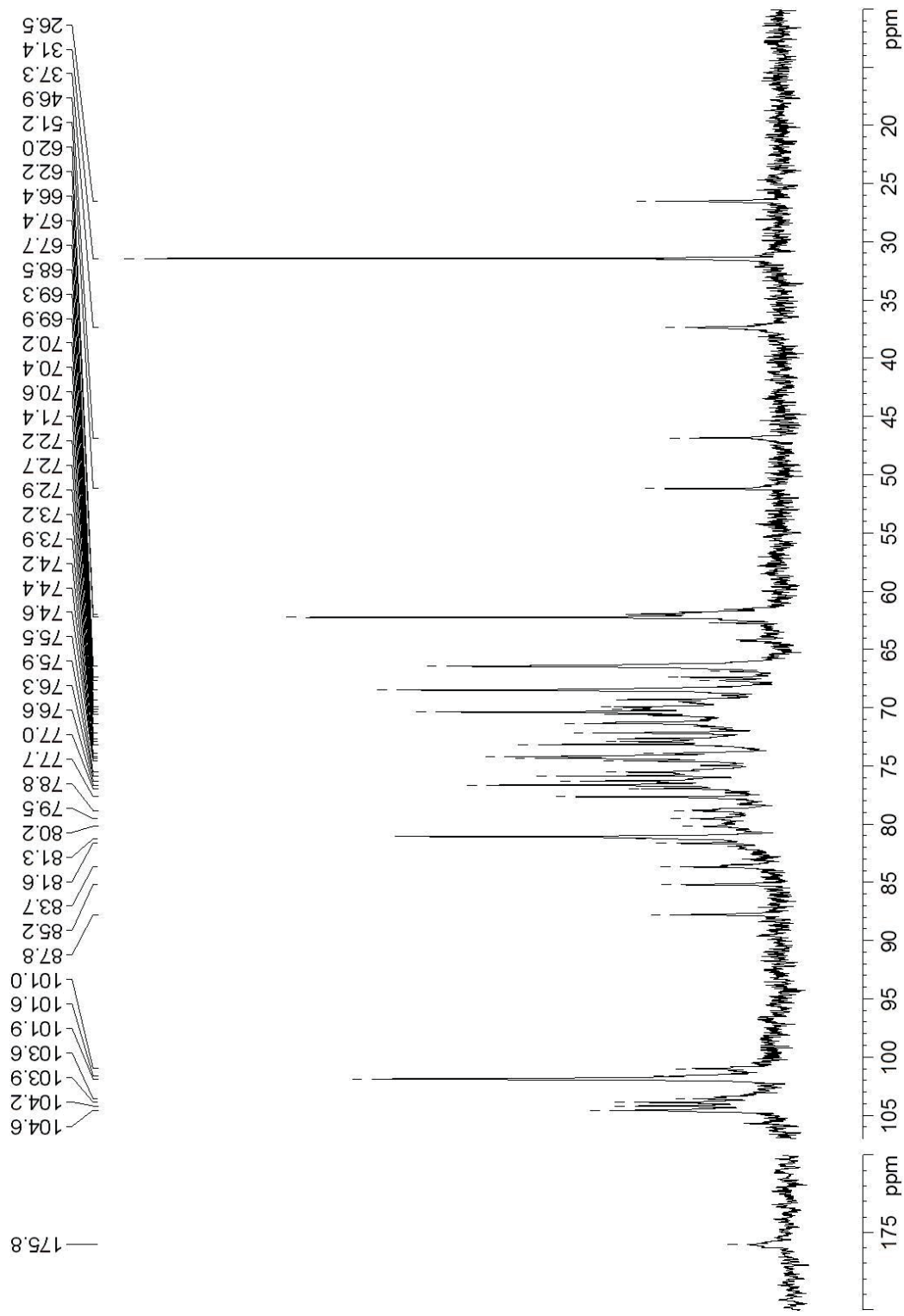
Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (31,45). FONTE: O autor (2018).

ANEXO 12 – ESPECTRO DE RMN DE COSY DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD1



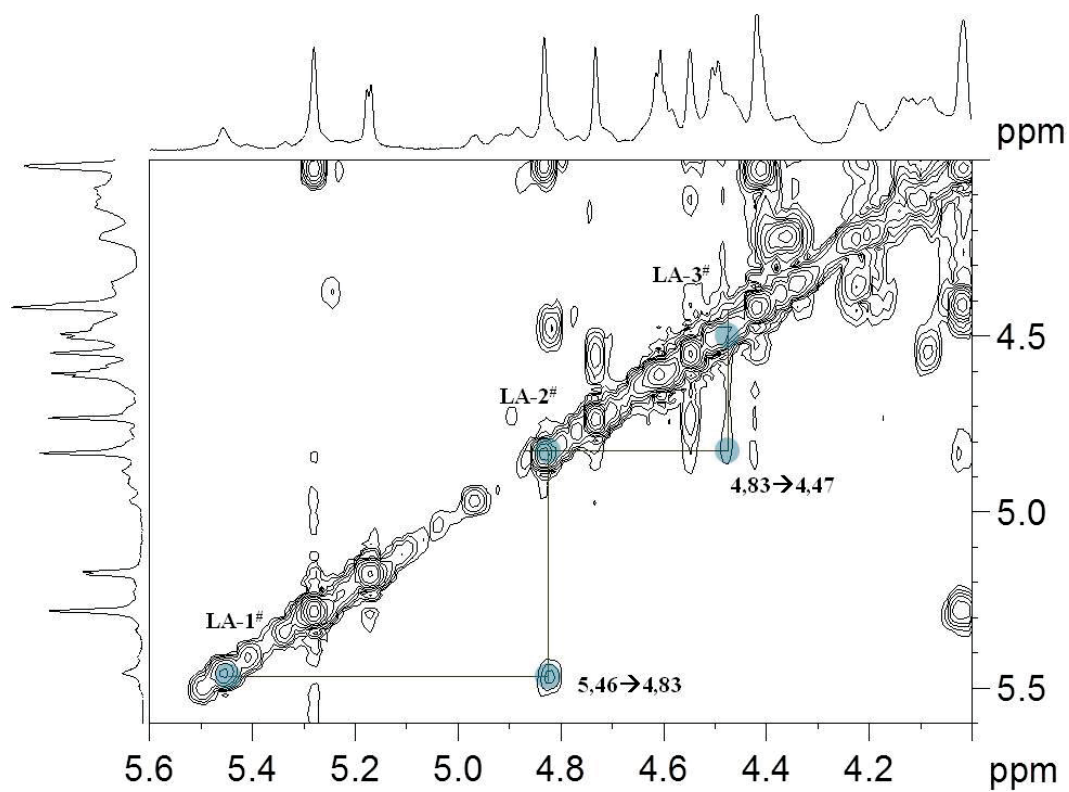


Solvente: D₂O, 70 °C; acetona como padrão interno (2,10). FONTE: O autor (2018).

ANEXO 13 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO POLISSACARÍDEO HÍBRIDO BG-KD2

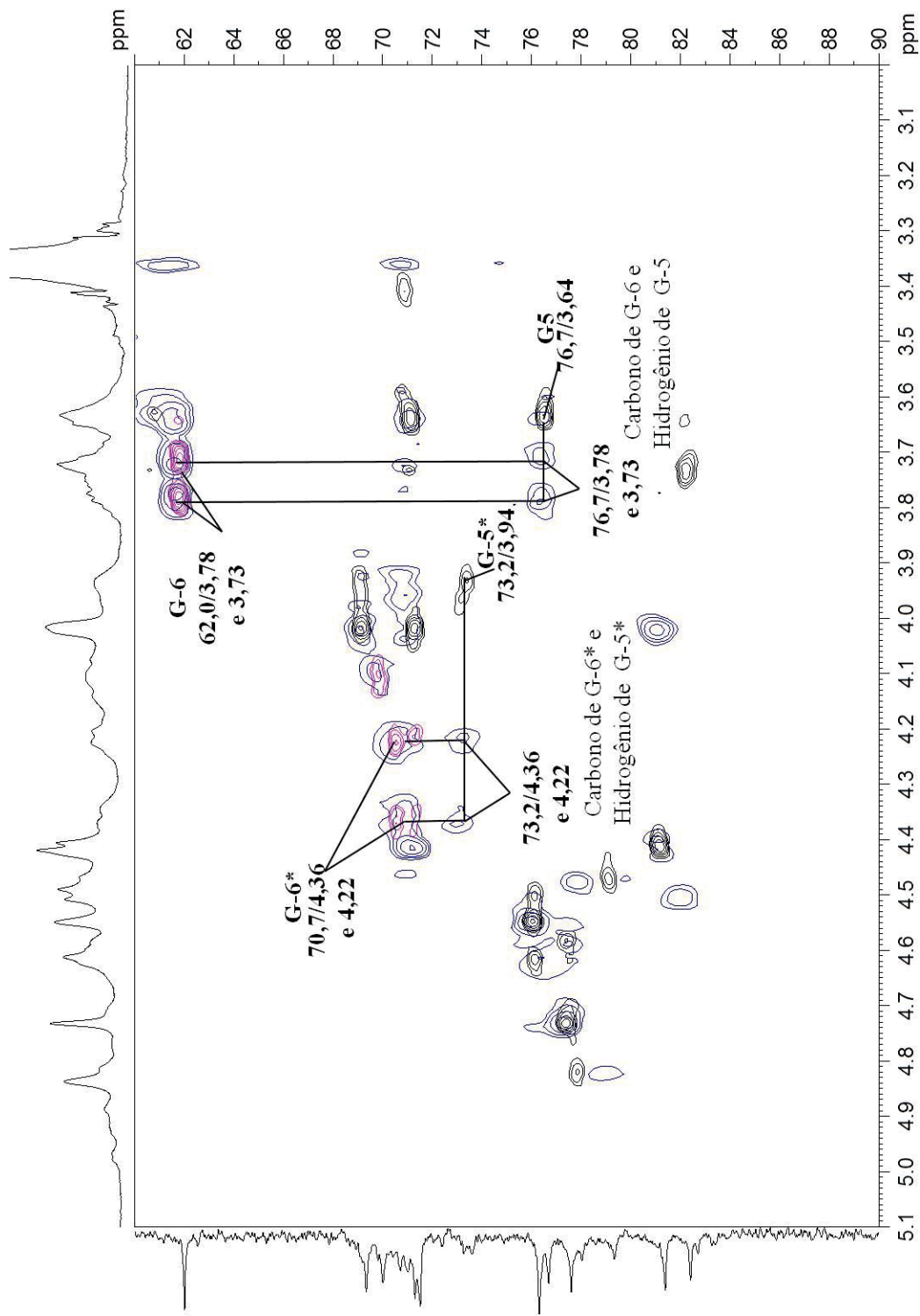
Solvente: D_2O , 70 °C; acetona como padrão interno (31,45). FONTE: O autor (2018).

ANEXO 14 – ESPECTRO DE RMN DE COSY DA FRAÇÃO AGA-TS

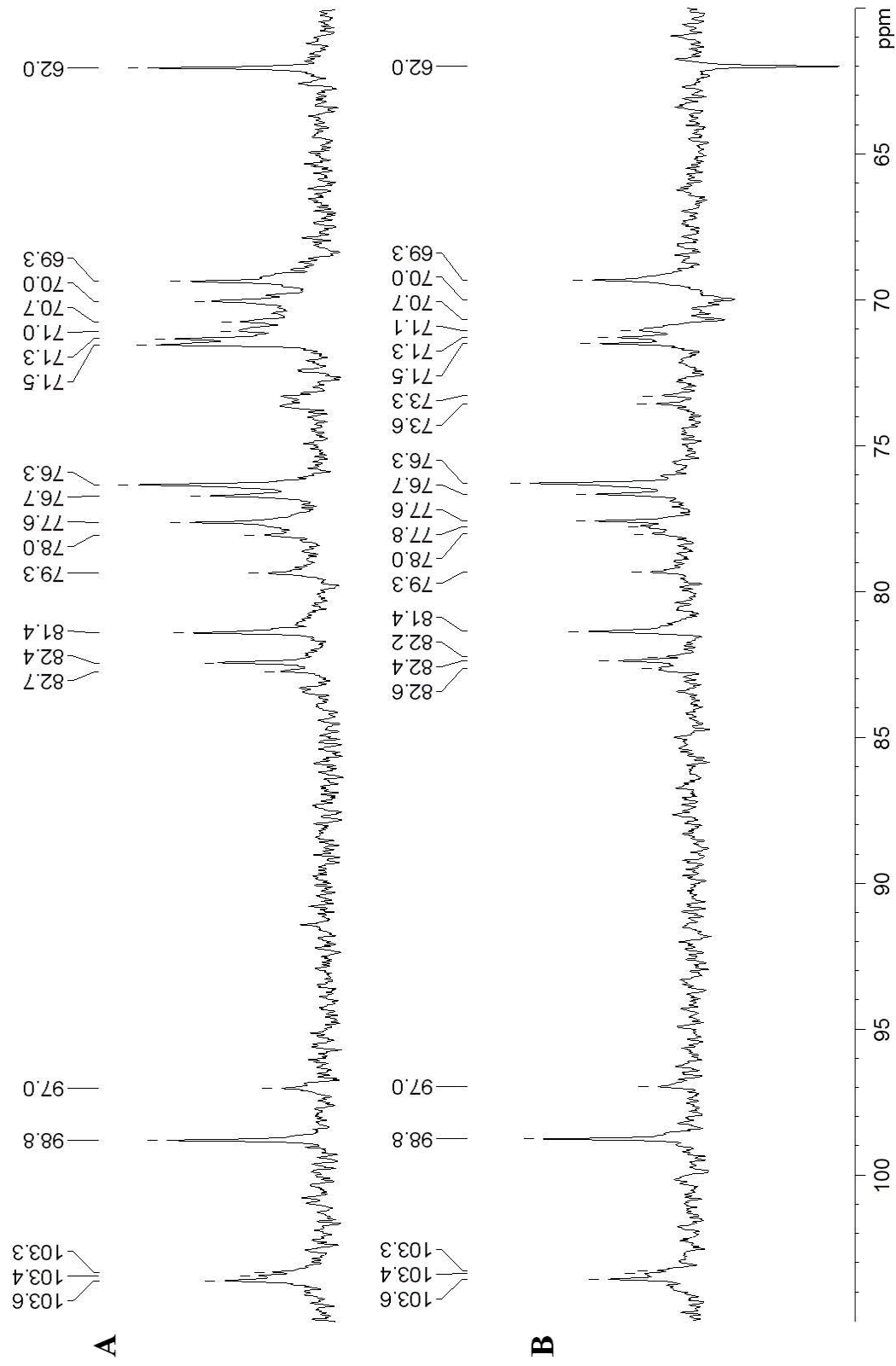


Solvente: DMSO-d₆, 70 °C; DMSO-d₆ como padrão interno (2,696). FONTE: O autor (2018).

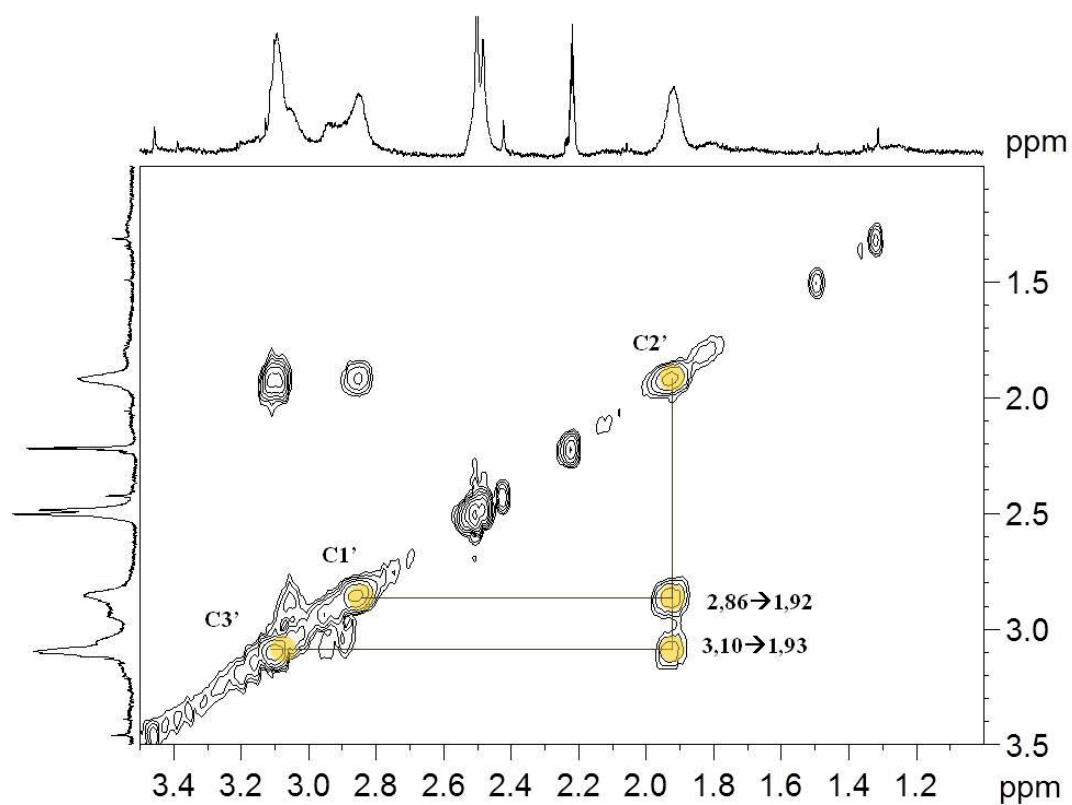
ANEXO 15 – ESPECTRO DE HSQC-EDITADO E HSQC SOBREPOSTOS DA FRAÇÃO A GA-TS



Solvente: DMSO-d6, 70 °C; DMSO-d6 como padrão interno (41,53/2,696 ppm). FONTE: O autor (2018).

ANEXO 16 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (A) E ^{13}C DEPT (B) DA FRAÇÃO AGA-TSSolvente: DMSO-d₆, 70 °C; DMSO-d₆ como padrão interno (41,53 ppm). FONTE: O autor (2018).

ANEXO 17 – ESPECTRO DE RMN DE COSY DA FRAÇÃO AGA-DAP



Solvente: D₂O, 70 °C; Acetona como padrão interno (2,224 ppm). FONTE: O autor (2018).